

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Gilbert ALIBERT

LES ACIDES PHENOLIQUES ET LEUR METABOLISME CHEZ Quercus pedunculata (Ehrh.)



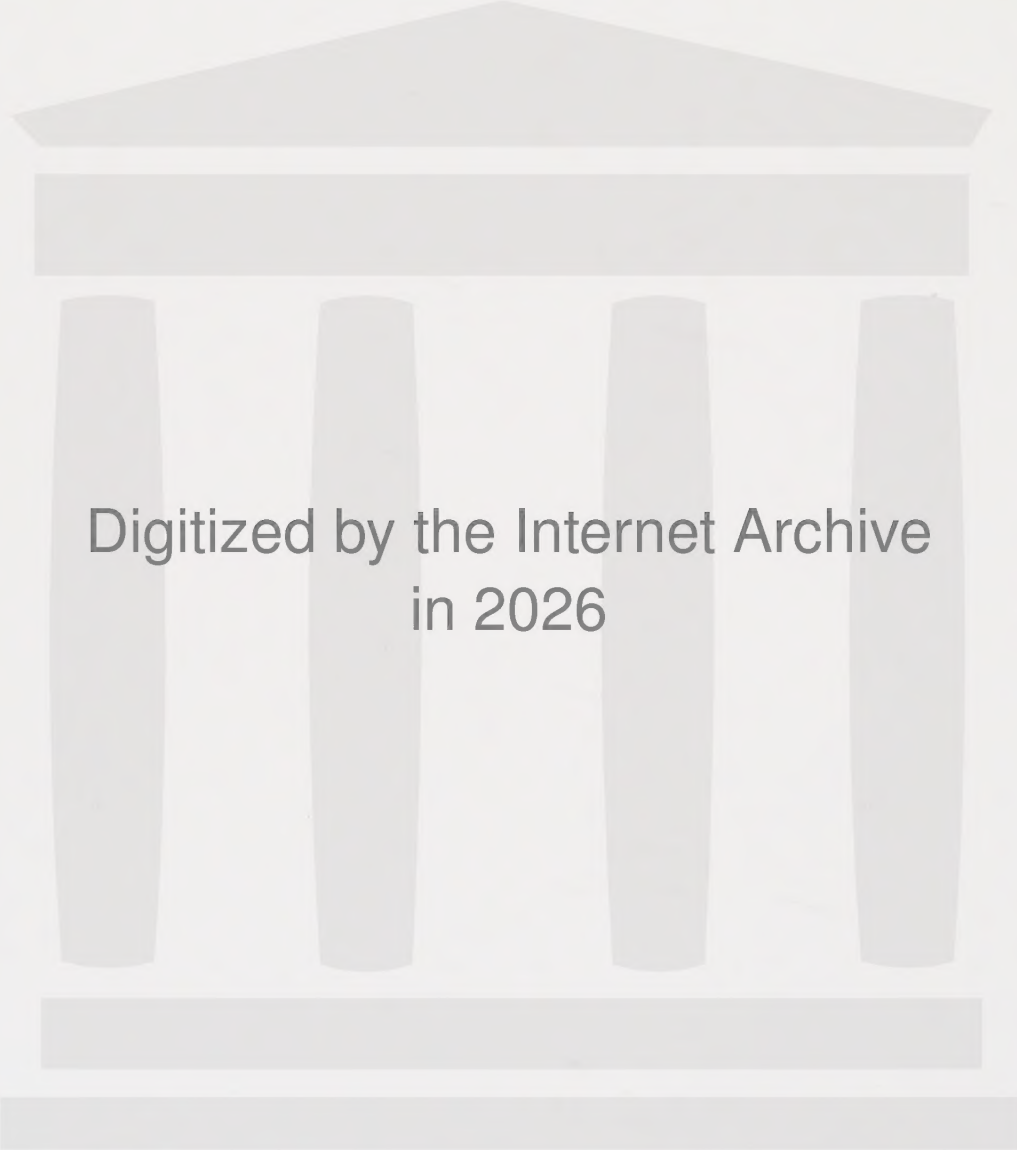
Soutenue le 3 Janvier 1975 devant la Commission d'Examen

MM. A. TOUZÉ

Président

H. DURANTON
P. RIBEREAU-GAYON
A.M. BOUDET
A. LATTES
C.F. VAN SUMERE

} Examinateurs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546616_0035

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Gilbert ALIBERT

LES ACIDES PHENOLIQUES ET LEUR METABOLISME CHEZ Quercus pedunculata (Ehrh.)



Soutenue le 3 Janvier 1975 devant la Commission d'Examen

MM. A. TOUZÉ

Président

H. DURANTON
P. RIBEREAU-GAYON
A.M. BOUDET
A. LATTES
C.F. VAN SUMERE

Examineurs

THESE

RECEIVED BY THE LIBRARY OF THE UNIVERSITY OF LEIDEN

LEIDEN, 1907

D. B. 10. 1. 1907



LES ACIDES PHÉNOLIQUES
ET LEUR MÉTAMORPHOSE
CHEZ QUELQUES BACTÉRIES (Chim.)

CHIMIE

Reçu le 10 Janvier 1907 par la Bibliothèque de la Faculté de Sciences de Leiden

Exemplaire

Dr. A. THIEZ

Dr. J. VAN DER

Dr. J. VAN DER

Dr. J. VAN DER

Dr. J. VAN DER

Dr. J. VAN DER

UNIVERSITE PAUL SABATIER

TABLEAU DU PERSONNEL SCIENCES

DIRECTION DE L'UNIVERSITE

M. LARENG	Président
M. MATHIS	1er Vice-Président
M. MARTIN	2ème Vice-Président

U.E.R. SCIENTIFIQUES

HONORARIAT

M. BEDOS	Professeur honoraire
M. BLAIZOT	Doyen honoraire
M. CAPDECOMME	Doyen honoraire, Recteur honoraire correspondant de l'Institut
M. DIEHL	Professeur honoraire
M. DUPOUY	Membre de l'Institut, Doyen honoraire, Directeur Général honoraire du C.N.R.S., Professeur honoraire
M. DURAND Emile	Doyen honoraire
M. ESCANDE	Professeur honoraire, Membre de l'Institut
M. GAUSSEN	Professeur honoraire, Correspondant de l'Institut
M. JACQUES	Professeur honoraire
M. MASDUPUY	Professeur honoraire
M. MATHIS	Doyen honoraire
M. MIGNONAC	Professeur honoraire
M. MORQUER	Professeur honoraire, Correspondant de l'Institut
M. SECONDAT	Professeur honoraire
M. TEISSIE-SOLIER	Professeur honoraire
M. VANDEL	Professeur honoraire, Membre de l'Institut
M. DUPIN	Professeur honoraire

PROFESSEURS

M. CAPDECOMME	Minéralogie, Correspondant de l'Institut
M. GALLAIS	Chimie, Membre de l'Institut
M. DURAND Emile	Physique
M. FERT	Physique
M. LESBRE	Chimie Organique
M. HURON	Mathématiques Appliquées
M. MARGULIS	Pédologie
M. TRICHE	Chimie Analytique et Spectrographie
M. LEDOUX	Zoologie Appliquée
M. RIVALS	Agriculture
M. PERRIER	Physique
M. MATHIS	Chimie
M. ORLIAC	Géochimie et Minéralogie
M. LAFOURCADE	Physique
M. ANGELIER	Ecologie
Mlle de FERRE	Botanique
M. FARRAN	Minéralogie et Géotechnique
M. LAUDET	Physique Théorique et Calcul Numérique
M. SERFATY	Biologie Animale
M. LAGASSE	Electrotechnique
M. BLANC	Physique Nucléaire
M. LEREDDE	Botanique
M. LELUBRE	Géologie
M. LALAGUE	Mathématiques Générales
M. BOUIGUE	Astronomie
M. ASSELINEAU	Chimie Biologique
M. MAURET	Chimie Systématique
M. AGID	Physiologie
M. MONTANT	Cryptogamie
M. GAUTIER	Physique

M. CRUMEYROLLE	Mathématiques
M. GOURINARD	Géologie
M. PULOU	Minéralogie
M. CAMBOU	Physique Spatiale
M. LACOSTE	Electrotechnique
M. THIBAUT	Mécanique Rationnelle et Appliquée
M. MASCART	Mathématiques
M. MEDIONI	Psychophysiologie
M. RAYNAUD Pierre	Physiologie Animale
M. ZALTA	Chimie Biologique
M. SEVELY	Electrotechnique
M. POMMIEZ	Mathématiques
M. REY Paul	Biologie Végétale
M. COULOMB	Physique
M. TRINQUIER	Physique
M. MARONI	Chimie
M. BEETSCHEN	Biologie Générale
M. DERACHE	Physiologie Animale
M. SATGE	Chimie Organique
M. LATTES	Chimie
M. VEDRENNE	Géophysique
M. DURAND-DE LGA	Géologie
M. CARRARA	Physique
M. JE ANNIN	Chimie Minérale
M. MAHENC	Chimie
M. MIROUZE	Géologie
M. BITSCH	Zoologie
M. DEGEILH	Physique
M. MARTIN J.C.	Génie Electrique
M. REY Gérard	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. SICARD	Biologie Génétique
M. SOUQUET	Géologie

PROFESSEURS ASSOCIES

M. ANDERSON	Physique Spatiale
-------------------	-------------------

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. PICCA	Physique
M. MERIC	Mathématiques Appliquées
Mme LECAL	Zoologie
M. PILOD	Physique
M. LARROQUE	Physique
M. BARRANS	Chimie
Mlle LAPEYRE	Mathématiques - Informatique
M. BERTRAND	Chimie
M. DESQ	Mathématiques
M. ROCARD	Electronique
M. POILBLANC	Chimie
M. TOUZE	Physiologie Végétale
M. FRASNAY	Mathématiques
M. CASSAGNAU	Zoologie
M. GUERIN	Mathématiques
M. PESCIA	Physique
M. SCHNEIDER	Biologie Cellulaire
M. de LOTH	Chimie Physique
M. SAPORTE	Physique
M. PERENNOU	Informatique
M. THENOZ	Génie Civil
M. CAUSSINUS	Mathématiques Appliquées
M. DURAND Ph.	Physique
M. CASTAN	Informatique
M. REME	Mesures Physiques
M. FONTAN	Physique Nucléaire

M. BAUDRAS	Chimie Biologique
M. CALVET	Mécanique des Fluides
M. PAGANI	Physique
M. BEAUFILS	Informatique
M. BERTHELEMY	Zoologie
M. TERJANIAN	Mathématiques
M. COLETTE	Physique

MAITRES DE CONFERENCES

M. ATTEIA	Mathématiques
M. CUPPENS	Mathématiques
Mlle BARBANCE	Mathématiques
M. VERDIER	Physique
M. GILLY	Génie Mécanique
M. COTTU	Génie Mécanique
M. ROUTIE	Physique Chimique
M. MARAL	Physique
M. HURAU	Physique
M. LEGRAND	Génie Civil
M. ABATUT	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. SOTIROPOULOS	Chimie Organique
Mme GERVAIS	Chimie Inorganique
M. BONEL	Chimie
M. MAUSS	Mécanique
M. BANCEL	Mathématiques
M. JOSSERAND	Mesures Physiques
M. BETOURNE	Informatique
M. CAMPAN	Psychophysiologie
M. CLERC	Mécanique
M. GRIFONE	Mathématiques
M. ETTINGER	Mathématiques
M. LETAC	Mathématiques
M. BONNET Louis	Biologie
M. LOUARN	Génétique
M. BOUDET	Physiologie Végétale

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

M. BACCAR	Chimie Organique
-----------------	------------------

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M. PRADINES	Mathématiques
M. NGUYEN THANH VAN	Mathématiques
M. GALINIER Michel	Informatique

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

PROFESSEURS

M. NOUGARO	Hydraulique Générale et Appliquée
M. GARDY	Génie Chimique
M. BIREBENT	Electronique Appliquée
M. VOIGT	Chimie Minérale
M. MONTEL	Chimie Physique et Electrochimie
M. THIRRIOT	Hydrodynamique (E.N.S.E.E.I.H.T.)
M. GRUAT	Mécanique des Fluides (Hydraulique)
M. BUGAREL	Génie Chimique
M. DAT	Mécanique des Fluides
M. MARTY	Physique Industrielle

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. HAMANT	Botanique
Mlle BERDUCOU	Physiologie Végétale
M. FALLOT	Biologie Végétale (Viticulture et Arboriculture)
M. TRUCHASSON	Mécanique
M. HOFFMANN	Electronique
M. ENJALBERT	Chimie
M. LEFEUVRE	Electronique (E.N.S.E.E.I.H.T.)
M. ANGELINO	Génie Chimique
M. DABOSI	E.N.S.C.T.

MAITRES DE CONFERENCES

M. MATHIEU	Chimie Analytique
M. TRANNOY	Physique (E.N.S.E.E.I.H.T.)
M. CASTAGNETTO	Mathématiques (E.N.S.E.E.I.H.T.)
M. GILOT	Génie Chimique (Institut du Génie Chimique)
M. CALMON	Techniques Agricoles
M. MATHEAU	Electronique

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M. NOAILLES	Informatique
-------------------	--------------

INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE

PROFESSEURS

M. ROQUES	Chimie Industrielle
M. GRATELOUP	Génie Electrique
M. MASO	Génie Civil
M. MIRA	Génie Electrique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. FAGET	Physique
M. DURAND Gilbert	Chimie
M. SCHUTTLER	Physique

MAITRES DE CONFERENCES

M. LETURCO	Génie Electrique
M. SIRIEYS	Génie Civil
M. BROUSSEAU	Physique
M. BESOMBES-VAILHE	Chimie
M. VERDIER Alain	Chimie

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M. LACAZE	Mathématiques
-----------------	---------------



ADMINISTRATION

M. PRINEAU	Secrétaire Général de l'Université
------------------	------------------------------------

A ma femme
Avec toute ma tendresse.

A mes enfants.

A mes parents.

A mes beaux-parents.

En hommage affectueux.

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université Paul Sabatier de Toulouse.

Alors qu'il dirigeait ce centre, Monsieur le Professeur A. BRUNEL m'a accueilli dans son laboratoire et m'a dès lors accordé une confiance qui ne s'est jamais démentie. Je voudrais aujourd'hui lui témoigner ma profonde reconnaissance. J'associerais à cet hommage Madame le Professeur G. BRUNEL auprès de laquelle j'ai toujours trouvé encouragements et conseils.

Monsieur A. TOUZÉ, Professeur de Physiologie Végétale à Toulouse a toujours eu à mon égard une attitude bienveillante. Il a d'autre part bien voulu assurer la présidence du Jury qui a jugé ce travail et je tiens à l'en remercier très sincèrement.

C'est à Monsieur A.M. BOUDET, Maître de Conférences à Toulouse que je dois ma formation de chercheur et la direction de mes recherches. Il a su allier à la qualité d'un maître celle, tout aussi rare, d'un ami et il m'est aujourd'hui particulièrement agréable de lui faire témoignage de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur H. DURANTON, de Strasbourg, m'a fait l'honneur de faire partie du Jury. Je lui sais gré d'avoir bien voulu distraire un peu de son temps pour me faire bénéficier de ses remarques.

Monsieur P. RIBEREAU-GAYON, Professeur à Bordeaux avait déjà participé à ma thèse de 3e cycle. Il a à nouveau accepté de me faire part de ses suggestions dans le domaine de la chimie des polyphénols. Je l'en remercie vivement.

Monsieur A. LATTES, Professeur de Chimie à Toulouse a accepté de porter sur le présent travail un jugement original, venant d'un membre extérieur à la spécialité. Je le remercie pour ses remarques judicieuses.

L'intérêt que Monsieur le Professeur C.F. Van SUMERE de l'Université de Gand (Belgique) portait depuis quelques années aux recherches effectuées dans notre laboratoire le désignait parmi les chercheurs étrangers pour faire partie de ce Jury. Il a bien voulu examiner mon mémoire et se déplacer à Toulouse malgré un emploi du temps chargé, pour me faire part de ses remarques. Qu'il me soit permis de lui exprimer ma gratitude.

Monsieur P. GADAL, Maître de Conférences à Nancy a été à l'origine avec M. A.M. BOUDET, de notre équipe de recherche. Il restera pour nous un exemple pour son enthousiasme et son dynamisme. Je le remercie également pour le concours qu'il a personnellement apporté à la réalisation de ce travail de recherche.

Enfin, j'ai toujours trouvé auprès de mes camarades de laboratoire Messieurs G. MARIGO et R. RANJEVA l'aide efficace tant sur le plan matériel que conceptuel, nécessaire à l'élaboration de cette Thèse. Je suis très heureux aujourd'hui de pouvoir leur exprimer ma gratitude et les assurer de mon amitié.

Monsieur le Professeur LEREDDE a eu l'amabilité de nous donner accès au microscope électronique de son laboratoire, Monsieur R. DARGENT

a réalisé les observations en microscopie électronique et Monsieur LUGARDON nous a fait bénéficier de son expérience dans ce domaine ; qu'ils en soient tous trois vivement remerciés.

Monsieur A. CARRASCO et Madame A. BOUDET ont apporté une aide technique efficace et je les en remercie vivement.

Enfin, que Messieurs G. CAVALIÉ, J.C. LATCHÉ, M. PIQUEMAL, Mademoiselle P. BALDY et Madame A. GRAZIANA, que j'ai maintes fois importunés, trouvent ici l'expression de ma gratitude.

Cette recherche n'aurait pu être effectuée au sein de notre équipe sans l'aide technique absolument essentielle de Madame ROUSSELES que je remercie tout particulièrement.

Enfin, que Madame VIALLELE qui a tapé cette Thèse, ainsi que toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

SOMMAIRE

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION.....	1
LES ACIDES PHENOLIQUES	3
LE MATERIEL VEGETAL	5

PREMIERE PARTIE

LES ACIDES PHENOLIQUES CHEZ *Quercus pedunculata* - IDENTIFICATION - ETAT NATUREL ET VARIATIONS QUANTITATIVES

CHAPITRE I.- METHODES D'ETUDES DES ACIDES PHENOLIQUES

I.- Séparation et identification des acides phénoliques par chromato-électrophorèse	13
II.- Séparation et dosage automatisés des acides phénoliques.....	18
III.- Extraction et purification des acides phénoliques	26

CHAPITRE II.- IDENTIFICATION ET ETAT NATUREL DES ACIDES PHENOLIQUES CHEZ *Quercus pedunculata* (Ehrh.)

I.- Identification des acides phénoliques présents dans les feuilles de Chêne	37
II.- Etat naturel des acides phénoliques.....	41
III.- Conclusions.....	47

CHAPITRE III.- VARIATIONS QUANTITATIVES DES ACIDES PHENOLIQUES AU COURS DE LA GERMINATION PUIS DE LA CROISSANCE DE LA RACINE CHEZ *Quercus pedunculata* (Ehrh.)

I.- Caractères généraux des variations des acides phénoliques.....	53
II.- Acides phénoliques et morphogénèse	55
III.- Conclusions.....	60

DEUXIEME PARTIE

LES PRINCIPALES VOIES DE BIOSYNTHESE DES ACIDES PHENOLIQUES ET LEUR REGULATION CHEZ *Quercus pedunculata*

INTRODUCTION	65
 <u>CHAPITRE I.- MATERIEL ET METHODES</u>	
I.- Le matériel végétal	71
II.- Les méthodes d'études métaboliques par la technique des traceurs radioactifs	71
III.- Méthodes d'étude des enzymes	73
IV.- La détection et le dosage de la radioactivité .	75
 <u>CHAPITRE II.- LES VOIES DE BIOSYNTHESE DES ACIDES PHENOLIQUES</u> <u>CHEZ <i>Quercus pedunculata</i> (Ehrh.)</u>	
I.- Biosynthèse des acides de la série cinnamique..	80
II.- Biosynthèse des acides de la série benzoïque ..	83
III.- Remarque	86
IV.- Conclusion	87
 <u>CHAPITRE III.- SUR QUELQUES ENZYMES DU METABOLISME DES ACIDES</u> <u>PHENOLIQUES CHEZ <i>Quercus pedunculata</i> (Ehrh.)</u>	
I.- Les enzymes de la voie C_6-C_3	91
II.- La voie C_6-C_1	104
III.- Conclusions	108
 <u>CHAPITRE IV.- REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES ACIDES PHENOLIQUES</u>	
I.- Mise en évidence de deux formes isofonctionnelles de la PAL dans les jeunes racines de <i>Quercus pedunculata</i>	117
II.- Régulation <u>in vitro</u> des deux formes isofonctionnelles de la PAL par les acides phénoliques	118
III.- Localisation intracellulaire de la phénylalanine ammonia-lyase, de la cinnamate-4-hydroxylase et de la "benzoate synthase"	121

IV.- Formation séquentielle, à partir de la phényl- alanine, des acides cinnamiques, p-coumarique et caféique, par une fraction microsomale isolée	132
V.- Discussion Générale	135
CONCLUSIONS GENERALES	139
ANNEXE.- SYNTHÈSE ENZYMATIQUE DE L'ACIDE p-COUMARIQUE U ¹⁴ C	145
BIBLIOGRAPHIE	151

INTRODUCTION

Les progrès accomplis dans la connaissance biochimique des organismes ont conduit à distinguer les "métabolites primaires" unités fondamentales, communes à tous les êtres vivants et les "métabolites secondaires", de répartition plus restreinte, qui expriment l'individualité des grands règnes, des genres ou parfois même des espèces.

Les composés aromatiques qui représentent chez les plantes les constituants les plus abondants après les glucides font partie des "métabolites secondaires" (NEISH, 1960) et les structures phénoliques complexes comme les tannins (employés depuis l'Antiquité pour le tannage des peaux), les lignines (éléments constitutifs du bois) ou encore les anthocyanes (qui colorent les fleurs et les fruits) ont très tôt retenu l'attention des chercheurs.

Sans doute à cause d'une présence plus discrète, les études sur les unités phénoliques simples ont débuté plus tardivement. Parmi ces substances, les acides phénoliques occupent une place particulière en raison de leur répartition générale, de leur position biogénétique essentielle dans la formation des autres structures aromatiques, ou encore du rôle qu'on leur attribue dans divers phénomènes physiologiques.

Au cours du travail présenté dans cette thèse je me suis proposé d'aborder de façon approfondie différents problèmes relatifs aux acides phénoliques chez un même végétal, Quercus pedunculata (Ehrh.).

Dans la première partie, des méthodes analytiques nouvelles ayant trait à ces composés sont tout d'abord développées en détail. Par la suite sont abordées l'identification des acides phénols, la recherche de leur état naturel et l'étude de leurs variations quantitatives. Ce dernier aspect débouche sur le problème de leur intervention dans la régulation de la morphogénèse.

La seconde partie traite du métabolisme des acides phénoliques et de son autorégulation cellulaire. La mise en oeuvre conjointe de techniques radiochimiques et enzymatiques permet de donner une vue complète des voies de biosynthèse des acides benzoïques et cinnamiques chez Quercus. Le contrôle par la plante de la production des différents termes des deux séries est ensuite envisagé au niveau de la régulation des activités des biocatalyseurs et de leur localisation intracellulaire.

TABLEAU I
ACIDES BENZOÏQUES

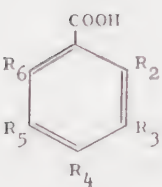
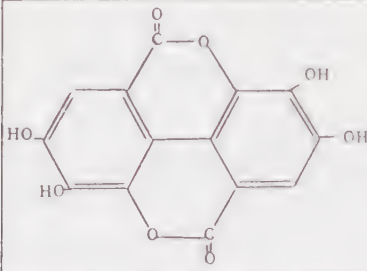
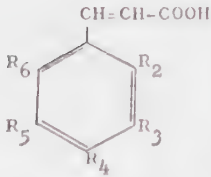
Formule générale	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Dénomination usuelle des acides
						BENZOÏQUE*
	OH					SALICYLIQUE
		OH				m-HYDROXYBENZOÏQUE
			OH			p-HYDROXYBENZOÏQUE
		OH	OH			PROTocatechique
		OH		OH		α-RESORCYLIQUE
	OH		OH			β-RESORCYLIQUE
	OH				OH	3-PLISOMÉRIQUE
	OH			OH		GENTISIQUE
		OH	OH	OH		GALLIQUE
		O-CH ₃	OH			VANILLIQUE
		O-CH ₃	OH	O-CH ₃		SYRINGIQUE
						ELLAGIQUE**

TABLEAU II
ACIDES CINNAMÏQUES

Formule générale	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Dénomination usuelle des acides
						CINNAMIQUE
	OH					o-COUMARIQUE
		OH				m-COUMARIQUE
			OH			p-COUMARIQUE
		OH	OH			CAFEÏQUE
		O-CH ₃	OH			FERULIQUE
		O-CH ₃	OH	O-CH ₃		SINAPIQUE

* Les acides benzoïque et cinnamique ne possèdent pas de radical phénolique mais représentent les premiers termes de chacune des deux séries. Ils ont donc été envisagés avec les autres acides au cours de ce travail.

** L'acide ellagique dépourvu de radical carboxyle mais provenant de la condensation de deux molécules d'acide gallique a été également retenu pour cette étude.

LES ACIDES PHENOLIQUES

Les acides phénoliques sont connus depuis de nombreuses années (l'acide benzoïque a été découvert par Blaise de VIGNERE dès 1608, l'acide gallique par SCHEEL en 1786, l'acide ellagique par CHEUVREUL en 1825, l'acide salicylique par PIRA en 1935, etc...) et on désigne généralement sous ce terme des molécules à un seul noyau benzénique possédant une ou plusieurs fonctions phénol et un radical carboxyle directement fixé sur le cycle ou porté par une chaîne latérale.

En biochimie végétale cette définition englobe trois types de composés :

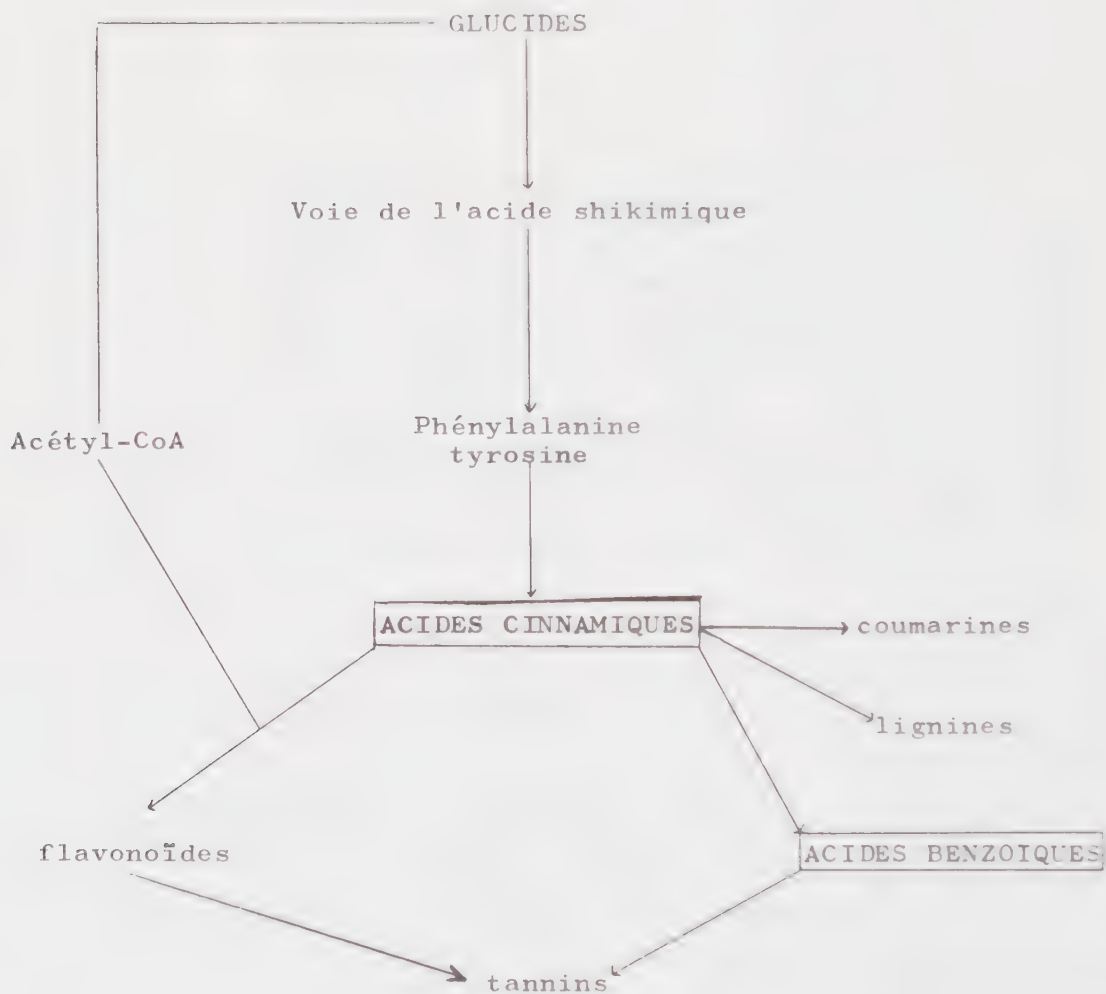
- les acides en C_6-C_1 ou benzoïques
- les acides en C_6-C_2 ou phénylacétiques
- les acides en C_6-C_3 comprenant les séries phénylpropionique et cinnamique.

En fait les acides benzoïques et cinnamiques s'avèrent les plus répandus chez les végétaux (HARBORNE et SIMMONDS, 1964) et actuellement le terme "acide phénolique" recouvre essentiellement des substances de ces deux séries*. Parmi ces dernières, seuls les composés mentionnés dans les tableaux I et II seront retenus dans cette étude. Enfin le tableau III permet de situer les acides des séries benzoïque et cinnamique dans le métabolisme végétal et de préciser leur position de précurseurs vis-à-vis des structures phénoliques plus complexes.

* Pour des commodités de rédaction, les acides benzoïques et cinnamiques seront parfois dénommés respectivement acides en C_6-C_1 et acides en C_6-C_3 . Cette terminologie recouvrira alors seulement les composés mentionnés dans les tableaux I et II.

TABLEAU III

Position des acides phénoliques (benzoïques et cinnamiques)
dans le métabolisme des végétaux



LE MATERIEL VEGETAL

Toutes les études effectuées au cours de ce travail ont concerné Quercus pedunculata (Ehrh.) (= Quercus robur L.).

Le genre Quercus a été retenu dans notre laboratoire comme matériel d'étude en raison de son aptitude à synthétiser les composés phénoliques. D'autre part, les caractères morphologiques très nets de l'espèce pedunculata permettent de distinguer facilement ce végétal de ses nombreux hybrides.

I.- CULTURE EN LABORATOIRE

1.- Récolte des glands

Afin de réduire les risques d'hybridation, les glands ont été récoltés le plus souvent dans la région de Lannemezan (Hautes-Pyrénées) où la densité de peuplement en Chêne pédonculé est importante (carte de la végétation de la France N° 71 par H. GAUSSEN et R. REY).

Peu de temps après leur chute (début novembre) les glands sont prélevés et stockés en chambre froide à + 4° C. Cependant, les semences perdent rapidement leur pouvoir germinatif, le taux de germination devenant pratiquement négligeable vers la fin du mois de mars.

2.- Cultures

Dans des bacs en bois de 1 m² de surface, on dispose de la tourbe sur une épaisseur de 50 cm. Les glands sont disséminés (200 glands) et recouverts par une couche de 5 cm d'épaisseur de la même tourbe. On maintient alors le support humide par des arrosages quotidiens à l'eau ordinaire et la culture se poursuit à l'obscurité totale (de façon à éliminer l'action de la lumière sur les composés phénoliques. Le métabolisme aromatique est, en effet, très sensible à ce facteur).

Le développement des racines est extrêmement variable au sein d'un même lot, aussi les stades d'étude ont-ils été définis non pas en fonction de l'âge mais de la longueur des racines et de l'apparition de l'épicotyle (planche 1). Le tableau IV donne les différents stades de développement retenus et la figure 1 l'évolution des masses de chaque organe.

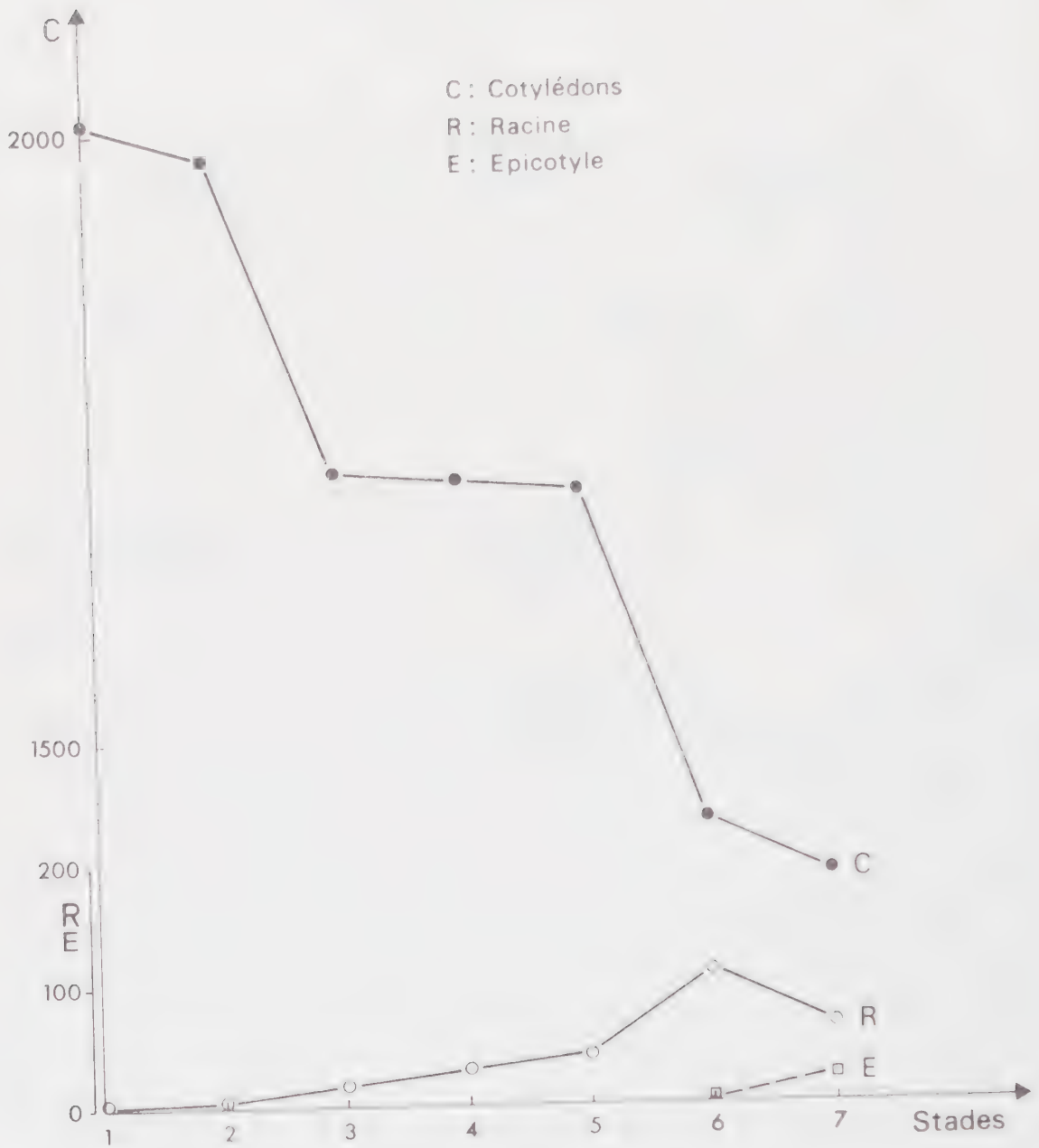


Figure 1 - Evolution des masses du matériel sec (cotylédons, racine, épicotyle) au cours de la germination puis de la croissance de la racine (résultats exprimés en mg par organe).



PLANCHE 1

Développement des jeunes plants sur tourbe

TABEAU IV

Stades d'étude des jeunes plants cultivés sur tourbe

Stades	Organes récoltés	Age (jours)	Caractéristiques morphologiques
1	Cotylédons Embryon	0	gland au repos , conservé à 4°C
2	Cotylédons Embryon	2-5	imbibition, l'enveloppe dure a éclaté la radicule perce
3	Cotylédons Racine	7-10	racine d'une longueur de 3 à 5 cm
4	Cotylédons Racine	10-15	racine d'une longueur de 8 à 10cm
5	Cotylédons Racine	15-20	racine d'une longueur supérieure à 10 cm
6	Cotylédons Racines	20-30	racine d'une longueur supérieure à 10 cm racines secondaires bien développées gemme à peine apparente
7	Cotylédons Racine Gemme + axe épi-cotylé	30-40	épicotyle d'une longueur de 1 cm

(Cultures effectuées aux mois de Novembre et Décembre 1972, dès la récolte des glands).

Si avec COME (1970) on considère "qu'une semence a germé lorsque la radicule a percé les enveloppes", on peut appeler "période de germination" le temps qui s'écoule entre la mise en culture des glands et leur récolte au stade 2 ; les stades suivants représentant différentes étapes de la croissance de la racine.

On retrouve l'évolution classique des organes au cours de la germination : en début de culture (stades 1 à 2) les masses sèches varient peu ; par la suite, l'augmentation de poids accompagne la croissance de la racine, la matière sèche doublant entre les stades 5 et 6.

REMARQUES : Dans les conditions de culture ainsi définies, le système racinaire ne présente aucune mycorhize ; ces dernières apparaissent plus tard lorsque les organes aériens commencent à se développer.

II.- PRELEVEMENTS DANS LA NATURE

Un certain nombre de déterminations a porté sur des feuilles récoltées dans la nature. Ces organes ont été prélevés sur un Chêne pédonculé de la région toulousaine vers 9 heures du matin.

III.- STABILISATION ET CONSERVATION DU MATERIEL VEGETAL

Le matériel végétal est toujours utilisé à l'état frais sauf pour les études analytiques où il est préalablement fixé par l'azote liquide puis lyophilisé.

Les caractéristiques du matériel étudié (nature, stade de développement, etc...) seront précisées chaque fois avant l'énoncé des résultats.

PREMIERE PARTIE
=====

LES ACIDES PHENOLIQUES CHEZ Quercus pedunculata - IDENTIFICATION -
ETAT NATUREL ET VARIATIONS QUANTITATIVES

CHAPITRE I.- METHODES D'ETUDES DES ACIDES PHENOLIQUES

CHAPITRE II.- IDENTIFICATION ET ETAT NATUREL DES ACIDES PHENOLIQUES
CHEZ Quercus pedunculata (Ehrh.)

CHAPITRE III.- VARIATIONS QUANTITATIVES DES ACIDES PHENOLIQUES AU
COURS DE LA GERMINATION PUIS DE LA CROISSANCE DE LA
RACINE CHEZ Quercus pedunculata (Ehrh.)

CHAPITRE I

METHODES D'ETUDES DES ACIDES PHENOLIQUES

I.- SEPARATION ET IDENTIFICATION DES ACIDES PHENOLIQUES PAR CHROMATO-ELECTROPHORESE

- 1.- La chromatographie-électrophorèse
- 2.- La révélation des acides phénoliques séparés par chromatographie-électrophorèse
- 3.- Conclusion

II.- SEPARATION ET DOSAGE AUTOMATISES DES ACIDES PHENOLIQUES

- 1.- Principe de la méthode
- 2.- Description de la méthode
- 3.- Résultats
- 4.- Intérêt de la méthode

III.- EXTRACTION ET PURIFICATION DES ACIDES PHENOLIQUES

- 1.- Extraction et purification des acides phénoliques à des fins qualitatives
 - a - L'extraction
 - b - Le fractionnement
 - c - Les hydrolyses
 - d - Purification des acides phénoliques libérés par les hydrolyses
- 2.- Extraction et purification des acides phénoliques à des fins quantitatives
 - a - L'extraction
 - b - Extraction sélective des combinaisons phénoliques
 - c - Hydrolyse alcaline
 - d - Purification de la fraction "acide phénolique"
 - e - Vérification du protocole expérimental, pourcentage de récupération
 - f - Conclusion

CHAPITRE I

METHODES D'ETUDES DES ACIDES PHENOLIQUES

I.- SEPARATION ET IDENTIFICATION DES ACIDES PHENOLIQUES PAR CHROMATO-ELECTROPHORESE

La chromatographie sur papier, introduite par BATE-SMITH (1948) dans l'étude des composés à noyaux aromatiques a permis des progrès considérables dans la connaissance de ces substances chez les végétaux.

En ce qui concerne les acides phénoliques, divers protocoles ont été proposés :

- chromatographie monodimensionnelle (BATE-SMITH, 1948 ; SWAIN, 1953 ; REIO, 1958 et 1960 ; STECK et WENDER, 1965),
- chromatographie bidimensionnelle (IBRAHIM et TOWERS, 1960 ; YANG et WENDER, 1962),
- chromatographie circulaire (Van SUMERE et al., 1957),
- chromatographie semi-préparative (RIBEREAU-GAYON, 1964),
- chromatographie sur couches minces (STAHL, 1962 ; THALLER, 1963 ; Van SUMERE et al., 1965).

Cependant, en ce qui concerne le Chêne, l'application de quelques-unes de ces techniques a révélé une très grande complexité du contenu phénolique du végétal ce qui m'a conduit à mettre au point un protocole original faisant appel à la chromato-électrophorèse.

1.- La chromato-électrophorèse

L'association de la chromatographie et de l'électrophorèse à des fins analytiques a déjà été utilisée par de nombreux auteurs pour la séparation de mélanges complexes de substances d'intérêt biologique (DURRUM, 1951 ; QUADEL et Van STRATEN, 1952 ; KICKHOFEN et WESTPHAL, 1952 ; MARINI-BETTOLO et LEDERER, 1954, etc...).

Son principe est le suivant : On dépose les composés à séparer dans le coin d'une feuille de papier puis on réalise une chromatographie ascendante dans un solvant déterminé. Après évaporation du solvant, le papier est imprégné d'un tampon et on effectue une électrophorèse dans un sens perpendiculaire à la migration chromatographique.

TABEAU V

Caractéristiques principales des acides phénoliques, en lumière ultraviolette et après révélation à la p-nitraniline ou à la benzidine

ACIDES CINNAMIQUES

ACIDES	U V		p-NITRANILINE		BENZIDINE
	254 mμ	366 mμ	Avant CO ₃ Na ₂	Après CO ₃ Na ₂	
CINNAMIQUE	Bleu F.	-	-	-	-
o-COUMARIQUE	Bleu	Bleu C.	Jaune C.	Violet	Jaune
m-COUMARIQUE	-	-	Rose	Rouge	Jaune
p-COUMARIQUE	Bleu F.	Bleu	Jaune M.	Bleu	Orange
CAFEIQUE	Bleu	Bleu V.	Jaune M.	Marron F.	Jaune M.
FERULIQUE	Bleu	Bleu C.	Rose	Bleu	Violet
SINAPIQUE	Bleu	Bleu V.	Rose C.	Bleu C.	Violet

ACIDES BENZOÏQUES

ACIDES	U V		p-NITRANILINE		BENZIDINE
	254 mμ	366 mμ	Avant CO ₃ Na ₂	Après CO ₃ Na ₂	
BENZOÏQUE	-	-	-	-	-
SALICYLIQUE	Bleu	Bleu C.	Jaune C.	-	-
m-HYDROXYBENZOÏQUE	-	-	Jaune	Rouge	Jaune
p-HYDROXYBENZOÏQUE	Bleu F.	-	Jaune	Rouge	Jaune
PROTocatechique	Bleu F.	-	Jaune	Gris Bl.	Jaune M.
α-RESORCYLIQUE	Bleu	Bleu C.	Orange	Orange	Rouge
γ-RESORCYLIQUE	Bleu	-	Jaune Ora	Jaune	Orange
β-RESORCYLIQUE	-	Bleu C.	Orange	Marron	Rouge
GENTISIQUE	Bleu	Bleu Ecl.	Gris	Gris Bl.	Blanc
GALLIQUE	Bleu F.	-	Jaune	Beige	Orange
VANILLIQUE	-	-	Jaune	Violet	Orange
SYRINGIQUE	-	-	Jaune Ora	Bleu	Mauve
ELLAGIQUE	Jaune M.	Jaune	Marron	Marron	-

B = Blanc ; C = Clair ; F = Foncé ; M = Marron ; V = Vert ; Ora = Orange ; Ecla. = Eclatant.

Cette technique qui fait donc appel à des propriétés très différentes des substances à séparer : solubilité dans les mélanges solvants, charge électrique, interactions avec le papier, présente un pouvoir de résolution très important.

Mise en oeuvre de la méthode :

Les solutions témoins : elles sont réalisées dans l'éthanol à 80° G.L., les quantités de substance déposées sur le papier correspondant en général à 10 microgrammes.

La chromatographie :

- solvant phase inférieure du mélange chloroforme - acide acétique - eau (2-1-1 v/v - YANG et WENDER, 1962)
- papier Whatman N° 3
- migration ascendante dans le sens perpendiculaire aux fibres du papier
- durée d'équilibration du papier avec l'atmosphère de la cuve contenant la phase supérieure du solvant, une demi-heure
- développement 6 heures (soit une migration du solvant sur une distance de $26 \text{ cm} \pm 1 \text{ cm}$ à partir du point de dépôt des substances)
- température $18^\circ \pm 1^\circ \text{ C}$
- séchage du papier, une heure sous hotte ventilée

L'électrophorèse (inspirée de PRIDHAM, 1963 et STURM et SCHEJA 1964).

- pulvérisation de 80 ml de tampon acétate d'ammonium de pH 6 sur chacune des deux faces de la feuille de papier (à 60 ml d'acide acétique pur PROLABO, on ajoute 840 ml d'eau distillée. On amène à pH 6 avec de l'ammoniaque concentrée PROLABO puis on complète à 1 litre avec de l'eau distillée. Ce tampon est dilué 30 fois avant l'emploi).
- électrophorèse à l'aide d'un appareil "Pherograph" tension 2000 volts (55 V/cm^2), intensité 60 à 80 mA, température du bain réfrigérant -5° C
- migration des composés vers l'anode, une heure et demie.

Remarque : L'acide ellagique reste au point de départ ; son identification a donc été effectuée séparément selon BOUDET (1965). Chromatographié pendant 12 heures dans le solvant butanol - acide acétique - eau (6-1-2) sur papier Whatman N° 1 imprégné de tampon phosphate de Sørensen pH 7,5 (BRUNEL, 1948), ce composé présente un Rf de 0,29 ($\pm 0,02$) inférieur à celui de tous les autres acides phénoliques.

2.- La révélation des acides phénoliques séparés par électrophorèse

Après séparation, la position de chaque acide peut être déterminée sur la feuille de papier en mettant à profit certaines propriétés de ces composés (tableau V) :

- absorption ou fluorescence en lumière ultraviolette (à 254 et 366 mμ ; Camag Universal UV Lamp, type TL 900).

TABLEAU VI

Valeurs des Rf (solvant chloroforme-acide acétique-eau, 2-1-1 v/v)
et mobilité électrophorétique des acides phénoliques

Acides phénoliques (dans l'ordre croissant des Rf)		Nombre radicaux -OH -O-CH ₃		Rf ± 0,05	Msa*
1	ELLAGIQUE	4	-	0	0
2	GALLIQUE	3	-	0	0,38
3	α RESORCYLIQUE	2	-	0,02	0,62
4	PROTocatechique	2	-	0,07	0,48
5	et 5' CAFEIQUE**	2	-	0,08	0,16 (0,61)
7	σ RESORCYLIQUE	2	-	0,20	0,81
6	GENTISIQUE	2	-	0,23	0,78
8	β RESORCYLIQUE	2	-	0,27	0,66
11	m.HYDROXYBENZOIQUE	1	-	0,39	0,87
9	p.HYDROXYBENZOIQUE	1	-	0,40	0,67
12	et 12' p.COUMARIQUE	1	-	0,53	0,36 (0,86)
13	m.COUMARIQUE	1	-	0,54	0,46
14	o.COUMARIQUE	1	-	0,64	0,45
17	VANILLIQUE	1	1	0,84	0,65
16	et 16' FERULIQUE	1	1	0,89	0,33 (0,82)
19	SYRINGIQUE	1	2	0,92	0,58
18	et 18' SINAPIQUE	1	2	0,93	0,24 (0,71)
21	SALICYLIQUE	1	-	0,95	1
22	BENZOIQUE	-	-	0,95	0,96
20	CINNAMIQUE	-	-	0,97	0,74 (0,87)

* Mobilité en électrophorèse exprimée par rapport à l'acide salicylique.

** Les deux valeurs indiquées entre parenthèses pour certains acides cinnamiques correspondent au dédoublement de leurs dérivés cis et trans constaté lors de la migration électrophorétique.

- réaction avec les diazoïques comme la p-nitraniline (SWAIN, 1953) ou la benzidine tétrazotée (RANDERATH, 1963).

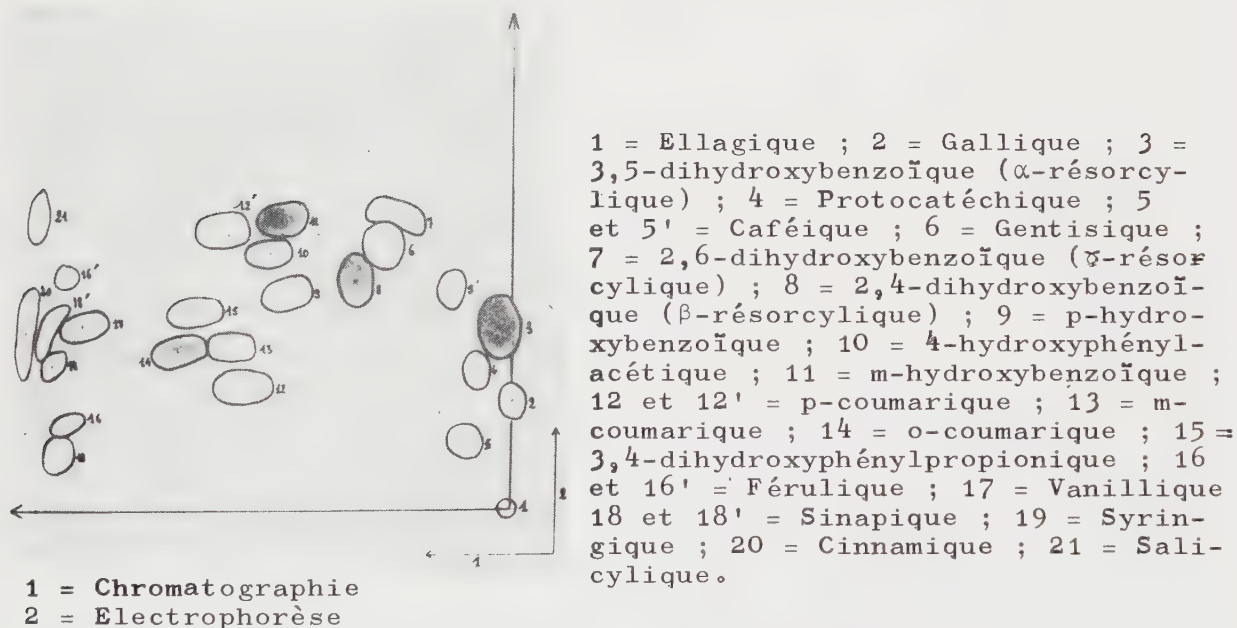
Le réactif de SWAIN a été modifié de la façon suivante : à 1,5 ml de p-nitraniline à 0,5 % dans HCl 2 N, on ajoute 0,5 ml de nitrite de sodium à 5 % et 20 ml d'acétate de sodium à 20 %. Dans ces conditions le fond reste jaune clair même après pulvérisation de CO_3Na_2 à 15 %, ce qui n'est pas le cas avec le réactif original.

3.- Conclusion

Le tableau VI résume les caractères des migrations chromatographiques et électrophorétiques et la photographie 1, la séparation obtenue en couplant ces deux méthodes selon la technique bi-dimensionnelle.

Photo 1

Séparation d'un mélange d'acides phénoliques témoins



La méthode de séparation et d'identification mise au point présente un certain nombre d'avantages par rapport aux techniques chromatographiques couramment utilisées :

- elle est rapide (durée totale 9 heures)
- elle est sélective : la migration chromatographique dépend du nombre de groupements OH et O-CH_3 fixés sur le cycle benzénique, la migration électrophorétique, au pH utilisé, fait appel uniquement à l'ionisation du groupement $-\text{COOH}$.

- son pouvoir de résolution est élevé (19 acides phénols sont séparés au cours d'une seule analyse) et de ce fait applicable à des extraits biologiques complexes.

- elle peut enfin donner des indications sur la structure moléculaire de composés dont la position sur la carte ne correspondrait à aucun des témoins utilisés.

La séparation et l'identification des acides phénoliques étant résolues par l'application de la chromato-électrophorèse, je me suis ensuite attaché au problème posé par le dosage de ces substances. En effet, aucune technique spécifique n'est à ce jour disponible pour l'étude quantitative des acides phénols.

II.- SEPARATION ET DOSAGE AUTOMATISES DES ACIDES PHENOLIQUES

Depuis quelques années se sont développées des méthodes de séparation et de dosage automatiques de diverses substances biologiques : acides aminés (SPACKMANN et al., 1958), sucres (KESSLER, 1967), acides organiques (CARLES, 1968). Pour les composés phénoliques en revanche, aucune technique de ce type n'a encore été mise au point. En 1959, SWAIN et HILLIS décrivaient une méthode de dosage des phénols totaux, EL BASYOUNI et TOWERS (1964), et plus récemment Van SUMERE et al. (1972) proposaient une estimation spectrophotométrique des acides phénoliques après séparation par chromatographie sur papier ou couches minces. Enfin, HANSON et ZUCKER (1963) envisageaient une chromatographie sur colonne de silice des dérivés de certains des acides cinnamiques, complétée par un dosage dans l'UV.

Avec l'apparition de la chromatographie en phase gazeuse, de nombreux auteurs pensaient voir ce problème résolu : cette technique donne en effet d'excellents résultats d'un point de vue qualitatif (WILLIAMS, 1962 ; KARLSEN et SVENDSEN, 1965 ; MENDEZ et STEVENSON, 1966 ; BLAKLEY, 1966 ; CATROUX et BLACHERE, 1966 ; HASHIZUME et al., 1967, etc...) et j'ai personnellement obtenu de très bonnes séparations à l'aide de cette technique. Cependant, la chromatographie en phase gazeuse s'est avérée d'application très difficile sur le plan quantitatif. Après un certain nombre de tentatives infructueuses, j'ai préféré retenir, pour le dosage des acides phénoliques, la chromatographie d'adsorption sur colonne couplée à la spectrophotométrie dans l'ultra-violet.

1.- Principe de la méthode

Le mélange d'acides à séparer est déposé au sommet d'une colonne d'adsorbant équilibré dans un mélange solvant et porté

à une température déterminée. On fait circuler dans la colonne un éluant dont la concentration varie au cours de l'analyse, et qui entraîne chaque acide phénolique en fonction de son adsorption sur le support et de sa solubilité dans la phase mobile.

En fin de colonne, l'effluent est conduit vers la cellule d'un spectrophotomètre enregistreur qui traduit sous forme de pics l'absorption des acides phénols dans l'UV. La mesure de la surface des pics permet de connaître, par référence à une courbe étalon, la quantité de chaque acide contenue dans l'extrait analysé.

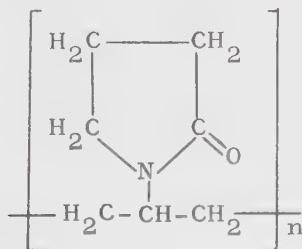
2.- Description de la méthode (L'ANVAR a déposé pour cette technique un brevet français d'invention N° 7301149).

En chromatographie d'adsorption, le choix du support est essentiel. Pour séparer des mélanges simples de composés phénoliques, certains auteurs ont utilisé les résines échangeuses d'ions (SEKI et al., 1959), la cellulose (PICTET et BRANDENBERGER, 1960), la silice (HANSON et ZUCKER, 1963) ou encore les poudres de polyamides (HÖRHAMMER, 1963). Aucun de ces adsorbants ne présente pour les composés phénoliques, un caractère de spécificité aussi marqué qu'un polymère du polyvinylpyrrolidone : le Polyclar* (MARIGO, 1973).

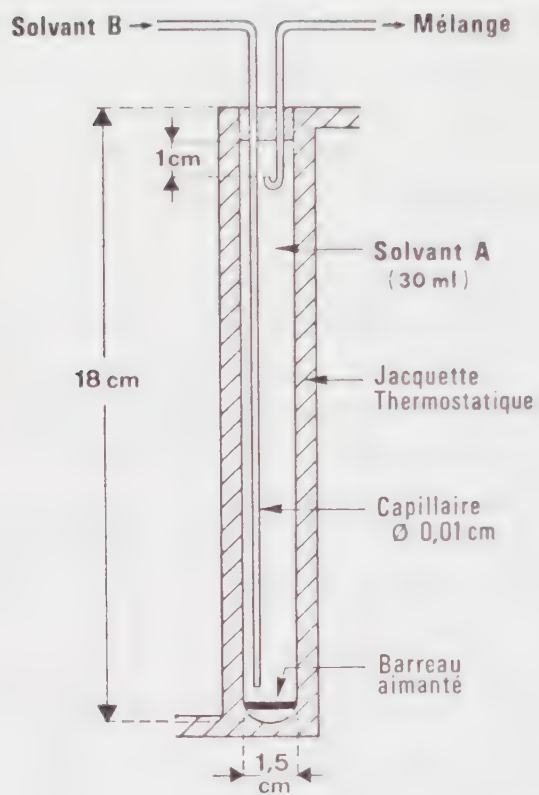
Les propriétés d'adsorption du Polyclar (General Anilin & Film Corp.) sont mises à profit, dans l'industrie, pour la clarification de la bière et du vin (Mac FARLANE, 1961; "Technical Bulletin" General Anilin & Film Corp. 1963) et dans les laboratoires de recherche pour la purification des extraits enzymatiques végétaux (LOOMIS et BATAILLE, 1966 ; SANDERSON et PERERA, 1966 ; WILSON et al., 1968 ; MARIGO, 1973) ou la séparation chromatographique des composés phénoliques (QUARMBY, 1968 ; HRAZIDINA, 1970 ; Van TEELING et al., 1971).

J'ai donc retenu ce polymère pour constituer la phase stationnaire solide des colonnes.

* Formule du Polyclar :



SCHEMA I



Dispositif utilisé pour réaliser un gradient
de concentration (solvant A enrichi en solvant B)

solvant A = éthanol - eau (65-35) - H_2SO_4 0,05 M
solvant B = éthanol - eau (30-70) - H_2SO_4 0,05 M

La mise au point de la méthode ayant été largement décrite par ailleurs (ALIBERT, 1973 a et b), je me bornerai à rappeler seulement les principaux aspects de la technique.

a - Le matériel

Le Polyclar AT est purifié par action de l'acide chlorhydrique à 10 % (1/5 p/v) pendant 10 minutes à ébullition sous reflux puis lavé par l'eau distillée jusqu'à neutralité. On tamise la poudre de façon à ne retenir que les grains de diamètre compris entre 60 et 200 μ puis on déshydrate par l'acétone. Avant utilisation, l'adsorbant est mis à gonfler dans le solvant pendant un quart d'heure sous agitation lente ; on laisse décanter puis on élimine le surnageant. Cette opération répétée à trois reprises permet de se débarrasser des fragments provenant de l'éclatement d'un certain nombre de grains au cours du gonflement.

L'eau et l'éthanol absolu utilisés comme éluants sont toujours redistillés avant l'emploi.

b - L'appareillage

Les colonnes de verre (100 x 1 cm) sont munies de jaquettes thermostatiques, la thermostatisation de l'ensemble de l'appareillage étant réalisée à l'aide d'un bain-marie électrique à circulation "HAAKE".

- Les solvants sont contenus dans des récipients à doubles parois : le premier contient un mélange éthanol - eau (65-35) - H_2SO_4 0,05 M (A) et le second un mélange éthanol - eau (30-70) - H_2SO_4 0,05 M (B).

- Un débit uniforme des solvants (1,08 ml/minute) est obtenu à l'aide d'une pompe péristaltique à débit réglable.

- Un gradient de concentration $A \rightarrow B$ est réalisé à l'aide du dispositif représenté par le schéma I (inspiré de HULME et WOOLTORTON, 1958).

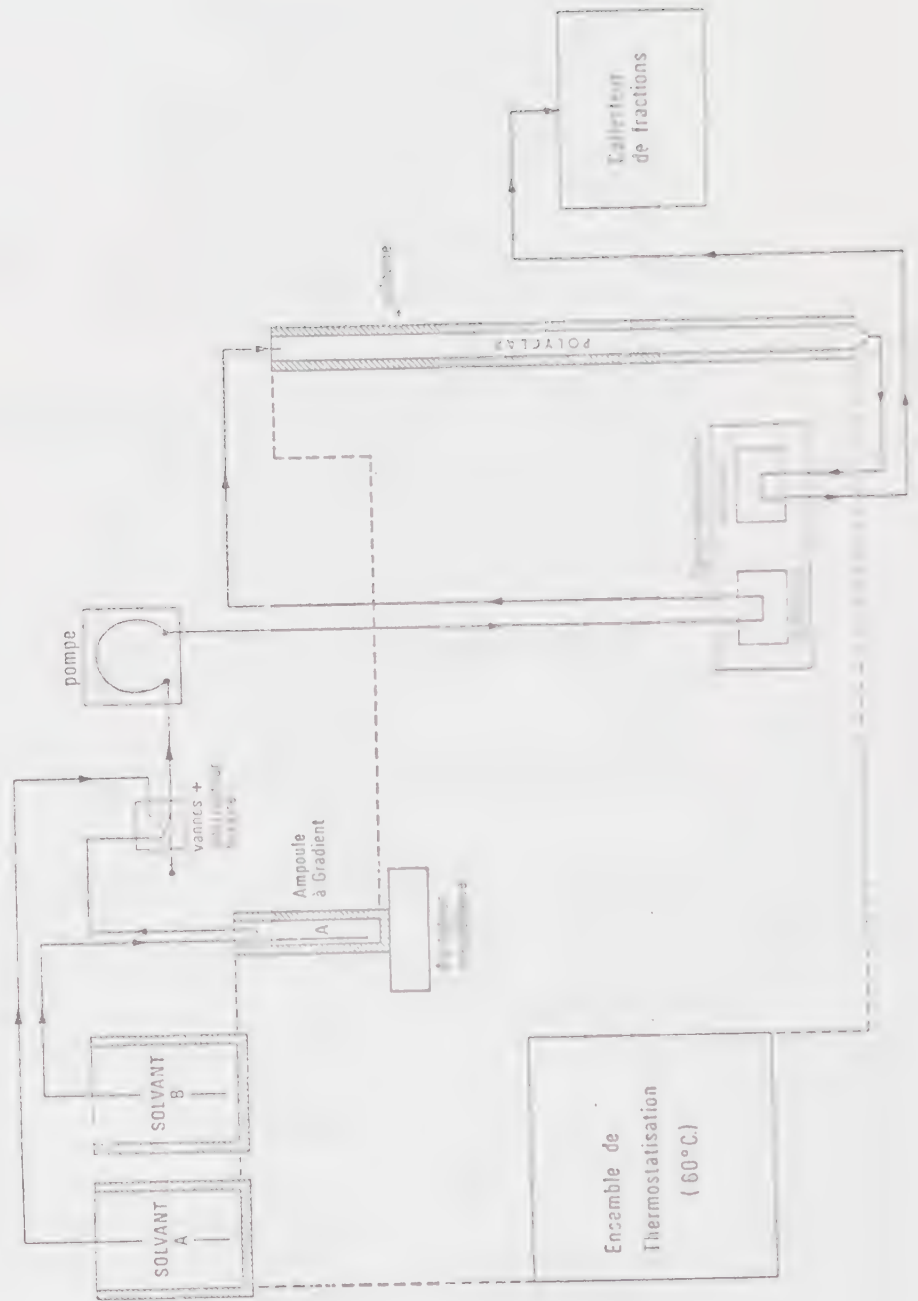
TABLEAU VII

Longueurs d'ondes retenues pour la détection et le dosage des différents acides phénoliques

λ (en nm)	235	265	320
Acides phénoliques	BENZOIQUE	CINNAMIQUE	p-COUMARIQUE
	SALICYLIQUE	m-COUMARIQUE	o-COUMARIQUE
	GENTISIQUE	p-HYDROXYBEN-	CAFEIQUE
	m-HYDROXYBEN-	ZOIQUE	FERULIQUE
	ZOIQUE	PROTocatechique	SINAPIQUE
	α -RESORCYLIQUE	β -RESORCYLIQUE	
	γ -RESORCYLIQUE	GALLIQUE	
		VANILLIQUE	
		SYRINGIQUE	

SCHEMA II

Dispositif utilisé pour la séparation et le dosage automatiques
des acides phénoliques



- La détection et le dosage des acides phénoliques en sortie de colonne sont enfin obtenus grâce à un spectrophotomètre BECKMAN DB (modifié pour l'analyse en flux continu), à trois longueurs d'ondes prédéterminées (tableau VII). L'enregistrement de la densité optique de l'éluant se faisant à raison d'une mesure toutes les 20 secondes pour un déroulement du papier de 7,5 cm/heure.

Le schéma II représente le dispositif utilisé pour la séparation et le dosage automatiques des acides phénoliques et les connections entre les différents éléments.

c - Le protocole

Les acides phénoliques, en solution dans le solvant A sont déposés au sommet de la colonne de Polyclar, équilibrée dans le même solvant.

Le corps de l'ampoule à gradient est rempli de 30 ml de solvant A (les solvants A et B ayant été portés préalablement à 70° C sous réfrigérant à reflux, avant utilisation), et se trouve en communication d'une part avec le récipient contenant le solvant B et d'autre part avec la colonne.

L'analyse débute par la mise en marche de la pompe.

Après 20 heures, un interrupteur horaire commandant un système de vannes admet à nouveau le solvant A sur la colonne ; après 4 heures l'ensemble de l'appareillage est alors prêt pour une nouvelle analyse.

3.- Résultats

La figure 2 montre le type d'élutogramme obtenu pour divers mélanges témoins d'acides phénoliques : dans les conditions retenues, la résolution est bonne pour la plupart des composés.

La figure 3 représente les courbes étalons tracées pour un certain nombre d'acides : il y a proportionnalité exacte entre la surface des pics et la quantité d'acide entre 0,1 et 1,5 micro-moles. La non-séparation des acides cinnamique et benzoïque ou des acides caféique et 2,4-dihydroxybenzoïque n'entraîne aucune difficulté pour leur dosage : aux longueurs d'ondes choisies, pour chacun des couples de substance, on n'observe aucune interférence dans l'absorption de la lumière. Il n'en est pas de même pour les acides sinapique et salicylique d'une part et pour les acides p- et m-coumarique et m-hydroxybenzoïque d'autre part, dont les spectres dans l'UV sont très semblables. On pourra éventuellement les recueillir sur un collecteur de fractions et les séparer à l'aide d'une autre technique comme la chromatographie électrophorèse par exemple.

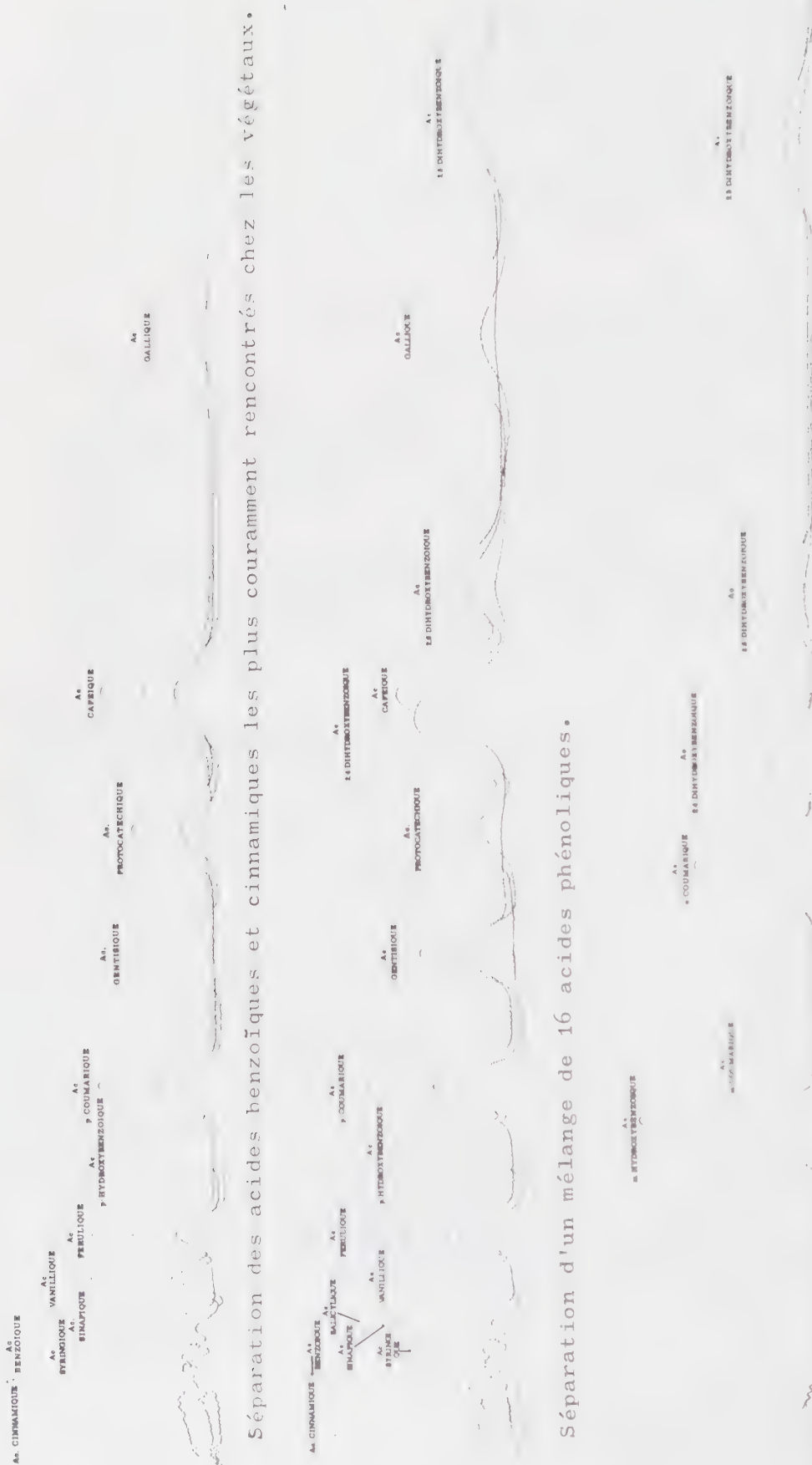


Figure 2 - Séparation des acides phénoliques sur colonne de Polyclar.

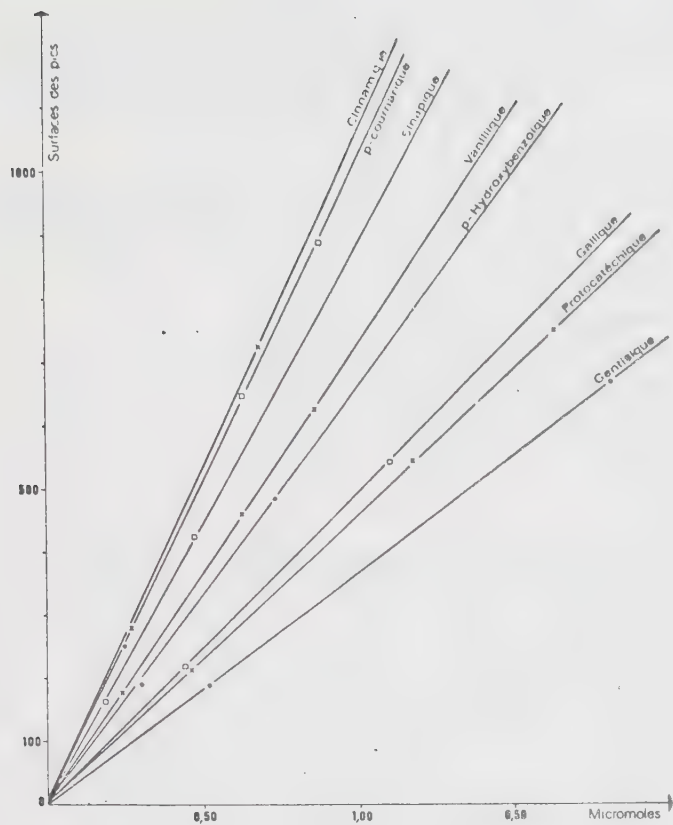
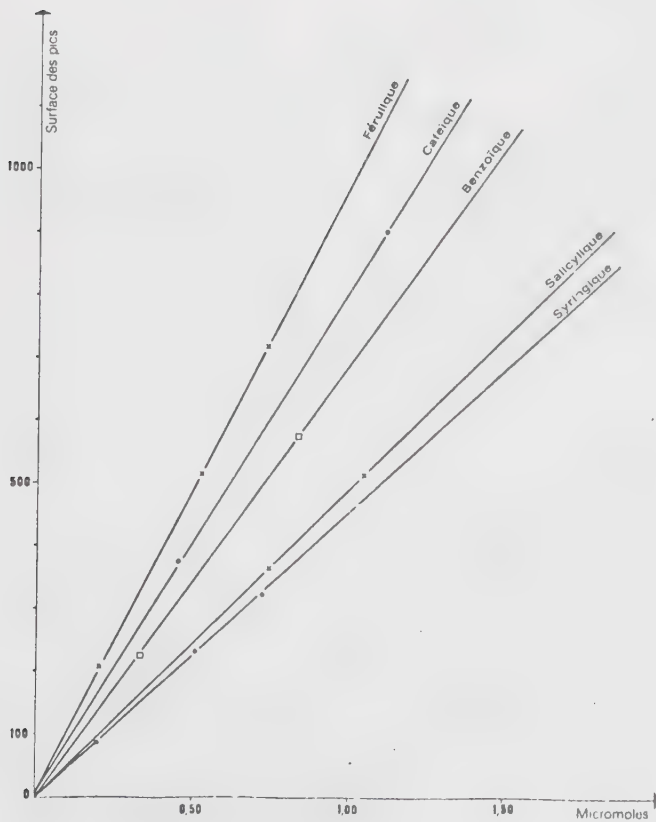


Figure 3 -

Courbes étalon établies pour les acides phénoliques les plus couramment rencontrés chez les végétaux.



4.- Intérêt de la méthode

La méthode qui vient d'être décrite, représente à l'heure actuelle la seule technique qui permette la séparation et le dosage simultanés et automatiques d'un nombre aussi élevé de composés phénoliques (15 acides phénols).

Par ailleurs, la stabilité des colonnes (plus de trois mois),
la rapidité relative des analyses (24 heures pour 15 composés),
la reproductibilité des résultats,
ainsi que la sélectivité et la sensibilité du dosage dans l'ultraviolet,
font de cette technique un excellent outil pour l'étude des acides phénoliques chez les végétaux.

III.- EXTRACTION ET PURIFICATION DES ACIDES PHENOLIQUES

L'extraction et la purification d'une série homogène de composés à partir d'un matériel végétal, doivent tenir compte d'un certain nombre d'exigences dictées par les propriétés physiques et chimiques des substances retenues et les caractéristiques de l'espèce étudiée.

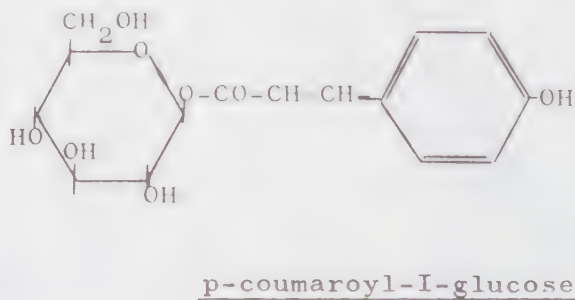
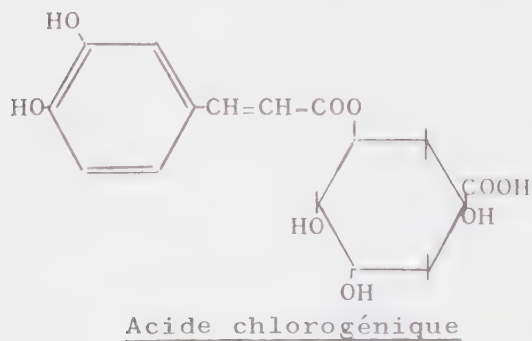
Par ailleurs, les protocoles doivent être adaptés au but recherché et seront donc différents selon que l'on désire effectuer des analyses qualitatives ou quantitatives.

Les mises au point qui vont suivre tiennent compte de ces différentes considérations.

1.- Extraction et purification des acides phénoliques à des fins qualitatives

Les acides phénoliques n'existent que très rarement à l'état libre chez les végétaux (HARBORNE et SIMMONDS, 1964) mais plutôt sous forme de combinaisons solubles* dans les solvants aqueux ou organiques (RIBEREAU-GAYON, 1965) ou totalement insolubles (EL BASYOUNI et al., 1964 a).

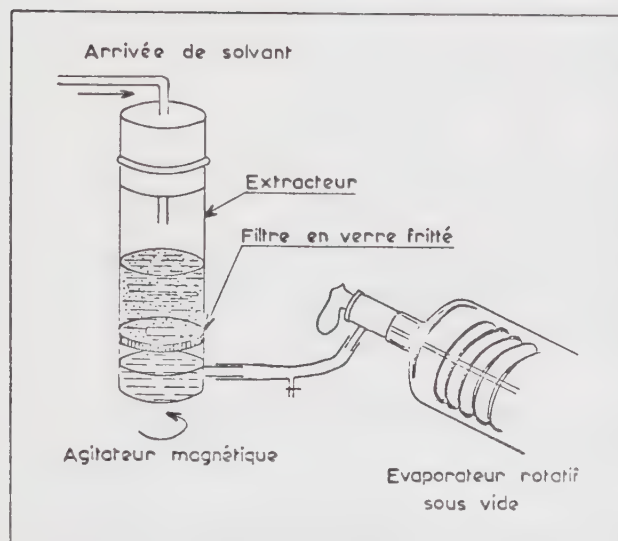
* Exemples de combinaisons solubles



Après de nombreuses expériences préliminaires, largement développées dans ma thèse de Spécialité (ALIBERT, 1968), j'ai retenu le protocole suivant :

a - L'extraction - Elle sera la plus exhaustive possible de façon à pouvoir mettre en évidence la réelle insolubilité de certaines combinaisons des acides phénoliques.

On place la poudre végétale (obtenue après broyage au broyeur à bille Dangoumau) dans un extracteur cylindrique, obturé dans sa partie inférieure par un filtre en verre fritté de porosité 3. L'extracteur est en relation d'une part avec le solvant et d'autre part avec le tube d'admission d'un évaporateur rotatif sous vide (figure 4). La dépression réalisée dans l'ensem-



ble du montage provoque un appel continu du solvant d'extraction mis en contact intime avec la poudre végétale par agitation magnétique. L'extract est ensuite dans le ballon d'évaporation où il distille à 30° C.

Les substances phénoliques sont extraites successivement par le mélange éthanol - acétate d'éthyle (1-1), l'éthanol à 95° G.L., l'éther éthylique et enfin l'eau distillée. Chaque solvant contient du méta-bisulfite de potassium pour limiter les oxydations (BEMILLER et al., 1967 ; KHANNA et al., 1968) et l'épuisement du matériel se poursuit jusqu'à absence de réaction de l'extract au réactif chlorure ferrique - ferricyanure de potassium (SMITH, 1960) dont la sensibilité vis-à-vis des substances phénoliques est de l'ordre de 0,05 µg.

Figure 4 - Dispositif utilisé pour l'extraction en continu des composés phénoliques.

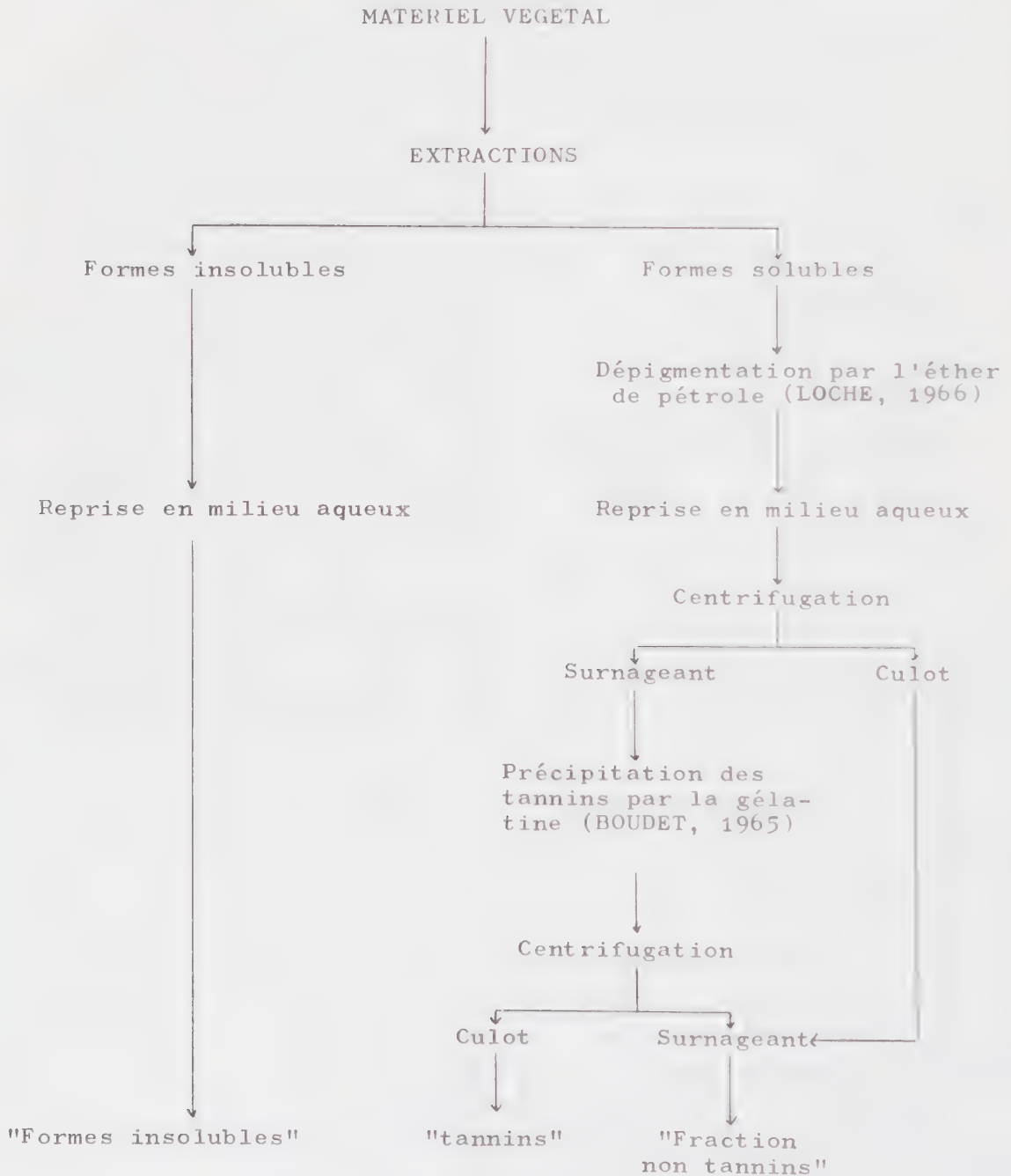
b - Le fractionnement - Le tableau VIII résume les différentes étapes de ce protocole qui aboutit à l'obtention d'une partie soluble (divisée en fraction "tannins" et "non tannins") et d'un résidu insoluble.

c - Les hydrolyses - On libère généralement les acides phénoliques de leurs combinaisons par des hydrolyses en milieu acide pour les éthers-oxydes et en milieu alcalin pour les esters ; cette spécificité n'étant cependant pas absolue.

IBRAHIM et TOWERS (1960) ont signalé la destruction plus ou moins complète des acides cinnamiques en milieu acide, aussi ai-je également retenu l'action de la β -glucosidase (émulsine NBC) qui rompt les liaisons éthers-oxydes avec le glucose.

TABLEAU VIII	
1	2
3	4
5	6
7	8
9	10
11	12
13	14
15	16
17	18
19	20
21	22
23	24
25	26
27	28
29	30
31	32
33	34
35	36
37	38
39	40
41	42
43	44
45	46
47	48
49	50
51	52
53	54
55	56
57	58
59	60
61	62
63	64
65	66
67	68
69	70
71	72
73	74
75	76
77	78
79	80
81	82
83	84
85	86
87	88
89	90
91	92
93	94
95	96
97	98
99	100

Schéma du fractionnement des différentes formes naturelles des acides phénoliques



Pour les hydrolyses minérales j'ai retenu le protocole de BOHM et TOWERS (1962) :

- Hydrolyse acide : Dans un erlenmeyer contenant l'extrait à hydrolyser, on ajoute le volume d'acide chlorhydrique (PROLABO 12 N) nécessaire pour amener le titre du milieu à 2 N. On ferme par un bouchon percé d'une canne de verre (servant de réfrigérant) on porte au bain-marie une heure à 100° C puis on refroidit sous un courant d'eau froide et on amène à pH 2, par la soude concentrée.
- Hydrolyse alcaline : On laisse barboter quelques minutes un courant d'azote dans une fiole de Yovanovitch contenant l'extrait ; on ajoute la lessive de soude (PROLABO 10 N) nécessaire pour amener la solution à 2 N. On bouche hermétiquement le récipient puis on laisse l'hydrolyse se poursuivre pendant 12 heures à 20° C. On acidifie à pH 2 par de l'acide chlorhydrique concentré en refroidissant dans un bain de glace.
- L'hydrolyse enzymatique est réalisée selon Van SUMERE et al. (1957) et HARBORNE et CORNER (1961) : On laisse agir la β -glucosidase à la concentration de 0,3 pour mille pendant 4 heures à 37° C dans un milieu amené à pH 5 par le tampon acétate de sodium (BRUNEL, 1948). La réaction est ensuite arrêtée en acidifiant à pH 2.

La fraction "non tannins" divisée en quatre parties égales, subit chacune des trois hydrolyses, la solution non hydrolysée servant à la recherche des formes libres des acides phénoliques. Les "tannins" ne subissent que l'hydrolyse acide et le résidu insoluble est attaqué séparément par l'acide et l'alcali après remise en suspension dans de l'eau distillée.

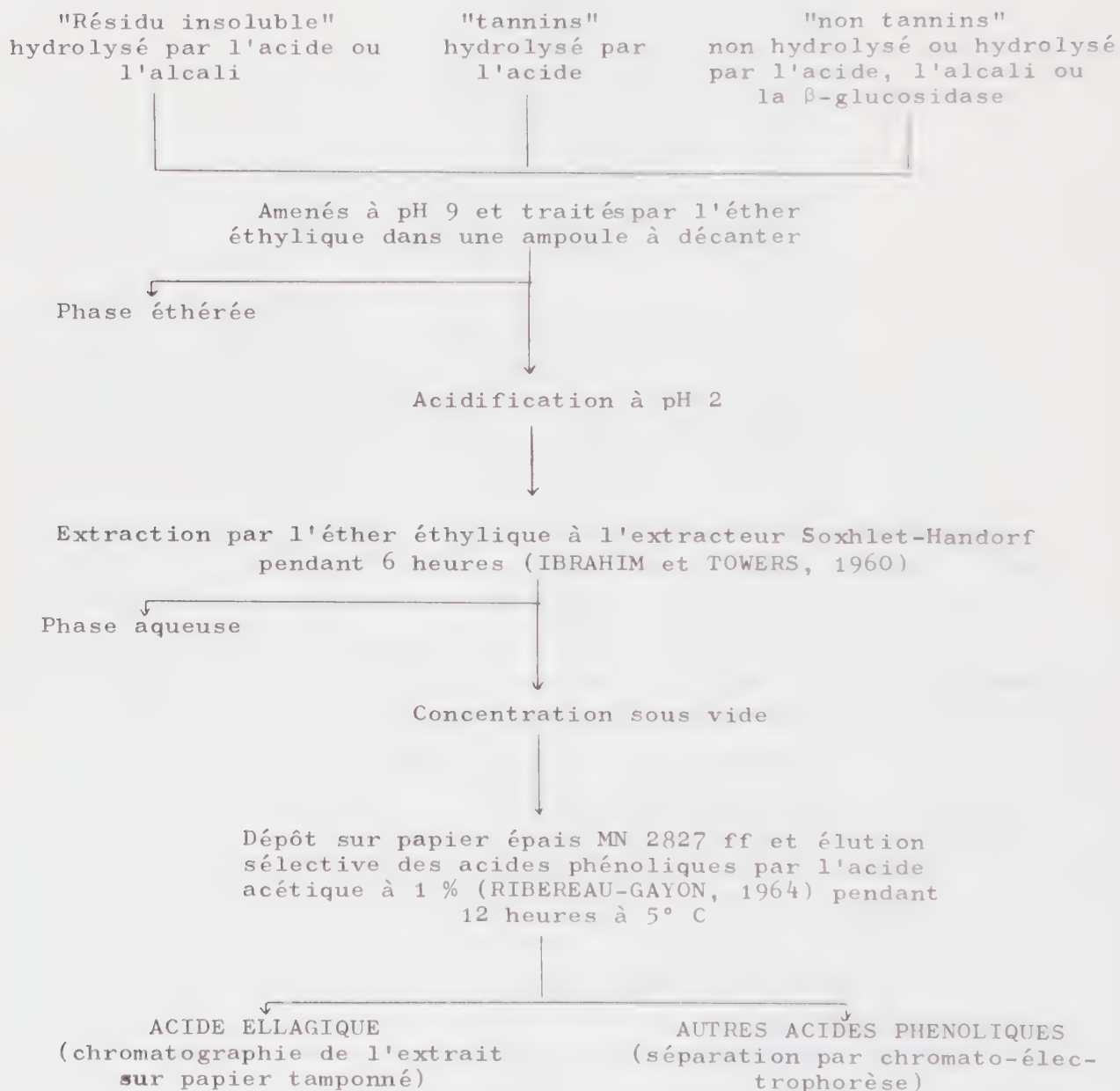
d - Purification des acides phénoliques libérés par les hydrolyses - Les différentes opérations de purification de la fraction "acides phénoliques" sont détaillées dans le tableau IX. Les extraits sont finalement repris par l'éthanol à 80° G.L. et les acides phénols qu'ils contiennent séparés et identifiés par chromato-électrophorèse.

2.- Extraction et purification des acides phénoliques à des fins quantitatives

Malgré de nombreuses tentatives il n'a pas été possible de mettre au point des conditions d'hydrolyse satisfaisantes des liaisons éther-oxydes : l'action des acides provoque à chaud la destruction totale de certains termes cinnamiques et l'hydrolyse enzymatique (β -glucosidase) n'est pas apparue comme suffisamment reproductible. Aussi, les recherches quantitatives concernent-elles uniquement les acides phénols présents sous forme ester.

TABLEAU IX

Purifications des différentes fractions phénoliques isolées



L'essentiel du protocole décrit pour les études qualitatives a été conservé, les modifications ayant pour but :

- d'obtenir spécifiquement au cours de l'extraction et du fractionnement les esters des acides phénoliques,
- de purifier de façon plus importante la fraction "acides phénols" libérée par hydrolyse alcaline,
- d'aboutir, pour chaque acide, à un pourcentage de récupération élevé et reproductible.

a - L'extraction - Elle est réalisée comme précédemment mais uniquement par l'alcool à 80° G.L. (contenant 0,05 % de métabisulfite de potassium à raison de 1 litre de solvant par gramme de matériel végétal sec).

b - Extraction selective des combinaisons phénoliques - Après précipitation des tannins par la gélatine, les combinaisons des acides phénoliques sont extraites par l'acétate d'éthyle. Selon RIBEREAU-GAYON (1964) en effet, ce solvant permet d'extraire facilement ces structures à partir des solutions aqueuses.

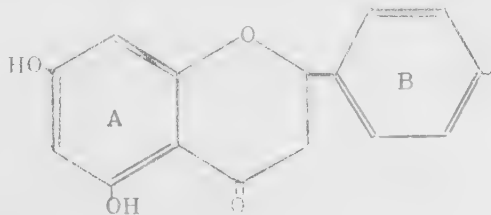
Après avoir ajouté à l'extrait débarrassé des tannins 2 % d'acide métaphosphorique et 20 % de sulfate d'ammonium (FLEURIET et MACHEIX, 1972), on transvase dans une ampoule à décanter et on extrait 5 fois par de l'acétate d'éthyle (1-1 v/v). On réunit les solutions organiques et on évapore à sec. Le résidu est repris par 4 fois 5 ml d'eau distillée que l'on récupère dans un tube à centrifuger (70 ml) d'une centrifugeuse Martin-Christ (type UJ1S).

c - Hydrolyse alcaline - Elle est réalisée directement dans le tube à centrifuger, sous courant continu d'azote, en milieu alcalin 2 N pendant 12 heures. On réacidifie ensuite à pH 1,5 par HCl concentré.

d - Purification de la fraction "acide phénolique" - Cette purification a été envisagée en limitant au minimum les changements brusques de pH (surtout en contact avec l'atmosphère) et les évaporations.

- Elimination des flavonoïdes. Les flavonoïdes possédant la structure du phloroglucinol (2 groupements hydroxyles en position 5 et 7 sur le noyau A*) sont

* Formule générale des flavonoïdes précipitables par la formaldéhyde.



précipités sélectivement par la formaldéhyde en milieu acide (HILLIS et URBACH, 1959). J'ai utilisé le protocole mis au point par KRAMLING et SINGLETON (1969). On ajoute à l'hydrolysat la quantité de formaldéhyde (MERCK) nécessaire pour obtenir une concentration finale de 0,16 % et on laisse la précipitation se poursuivre pendant 24 heures à la température du laboratoire. On sépare ensuite le complexe phénol - formaldéhyde par centrifugation pendant 20 minutes (centrifugeuse Martin-Christ) à 4500 rpm.

- Extraction des acides phénoliques. Les acides phénols sont extraits comme précédemment par l'éther éthylique à l'extracteur Soxhlet-Handorf, pendant 4 heures, la température du bain-marie étant fixée à 50° ($\pm 1^\circ$ C). L'éther éthylique est ensuite évaporé sous vide.
- Purification sur Sephadex LH 20. On réalise une colonne de Sephadex LH 20 (25 x 2 cm), équilibrée dans le solvant eau - acétone (80 - 20) - HCl 0,1 %. On dépose les acides phénoliques sur la colonne puis on les élue par le même solvant. On élimine les 150 premiers millilitres et on récupère les 320 ml suivants qui contiennent les acides phénols. On évapore à sec sous pression réduite et on reprend le résidu par le solvant A en vue de l'analyse automatique.

e - Vérification du protocole expérimental, pourcentage de récupération - J'ai tout d'abord recherché à quel niveau du protocole pouvaient se produire les pertes les plus importantes. Dans ce but, j'ai effectué chaque opération de la purification sur un mélange d'acides phénols témoins. Le tableau X indique la succession de ces différentes phases et le pourcentage de perte qui peut être attribué à chacune d'elles : seule l'hydrolyse provoque une destruction notable des composés étudiés, malgré les précautions prises pour sa réalisation.

Enfin, j'ai déterminé le pourcentage de récupération de chaque acide après avoir fait subir les différentes opérations de purification à un échantillon végétal (feuilles de Chêne) auquel était ajoutée une quantité connue d'acides phénols témoins. Le tableau XI résume les données obtenues pour deux essais différents et indique les valeurs définitivement retenues pour l'expression quantitative absolue des résultats.

TABLEAU XI

Pourcentages de récupération des acides phénoliques

Acides phénoliques	% de récupération pour les analyses		% de récupération retenu
	1	2	
CINNAMIQUE	100	90	100
p-COUMARIQUE	100	100	100
CAFEIQUE	77	80	80
FERULIQUE	82	71	80
BENZOIQUE	100	85	100
SALICYLIQUE	43	nd	40
GENTISIQUE	90	100	100
p-HYDROXYBENZOIQUE	81	90	90
PROTOCATECHIQUE	100	93	100
GALLIQUE	70	nd	70
VANILLIQUE	88	100	100
SYRINGIQUE	60	67	60

nd = Non déterminé

$$\% \text{ de récupération} = \frac{(\text{végétal} + \text{solution témoin}) - \text{végétal}}{\text{solution témoin}} \times 100$$

f - Conclusion - Malgré sa complexité, le protocole mis au point permet donc de connaître la quantité exacte de chaque acide phénolique contenu dans un matériel végétal donné. Il est certain que le Chêne représente une situation extrême en raison de la diversité de son contenu phénolique : unités simples (ALIBERT et al., 1969 ; MARIGO et ALIBERT, 1969), flavonoïdes (MARIGO, 1973), tannins (BOUDET, 1965), etc.. selon les caractéristiques propres à chaque végétal, quelques étapes pourront être raccourcies (extraction) ou éventuellement supprimées (précipitation des tannins ou des flavonoïdes par exemple).

CHAPITRE II

IDENTIFICATION ET ETAT NATUREL DES ACIDES PHENOLIQUES

CHEZ *Quercus pedunculata* (Ehrh.)

I.- IDENTIFICATION DES ACIDES PHENOLIQUES PRESENTS DANS LES FEUILLES DE CHENE

- 1.- Les acides des séries benzoïque et cinnamique
 - a - Les acides benzoïques
 - b - Les acides cinnamiques
- 2.- Autres structures benzéniques

II.- ETAT NATUREL DES ACIDES PHENOLIQUES

- 1.- Les formes solubles
 - a - La fraction "non tannins"
 - b - Les acides phénoliques de la fraction "tannins"
- 2.- Les formes insolubles des acides phénoliques
 - a - Mise en évidence
 - b - Présence d'acides phénoliques liés aux protéines dans les feuilles de Chêne

III.- CONCLUSIONS

CHAPITRE II

IDENTIFICATION ET ETAT NATUREL DES ACIDES PHENOLIQUES CHEZ Quercus pedunculata (Ehrh.)

J'ai pu noter au cours de travaux préliminaires que comparativement aux autres parties de la plante, le contenu en acides phénoliques des feuilles du Chêne était le plus varié. J'ai donc retenu ces organes pour l'identification des acides phénoliques et la caractérisation de leur état naturel.

Les études ont porté sur des feuilles jeunes (récoltées au mois d'avril, peu après le débourrement) et des feuilles âgées (prélevées au mois d'octobre) de façon à obtenir les données les plus complètes possibles sur l'existence de ces composés chez le végétal.

Les déterminations ont été effectuées dans tous les cas à partir de 100 mg de matériel végétal sec.

I.- IDENTIFICATION DES ACIDES PHENOLIQUES PRESENTS DANS LES FEUILLES DE CHENE

1.- Les acides des séries benzoïque et cinnamique

Les composés identifiés chez le Chêne aux deux stades de végétation retenus sont mentionnés dans le tableau XII.

a - Les acides benzoïques - La diversité du contenu en acide benzoïque est remarquable : 10 acides de cette série peuvent être mis en évidence chez Quercus. L'acide benzoïque, très rarement signalé en raison des difficultés que pose sa localisation sur les chromatogrammes (voir tableau V), est également présent chez le Chêne ; il a été identifié de façon irréfutable par chromatographie sur colonne de Polyclar comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

Le Chêne se distingue des autres plantes étudiées à ce jour par l'importance des termes benzoïques polyhydroxylés : acides gentisique, protocatéchique, 3,5-dihydroxybenzoïque, gallique et ellagique, ces deux derniers composés étant par ailleurs caractéristiques des Dicotylédones (HARBORNE et SIMMONDS, 1964).

TABLEAU XII

Acides phénoliques présents dans les feuilles de Quercus pedunculata à deux stades de végétation

Acides phénoliques	Feuilles jeunes	Feuilles âgées
<u>Série cinnamique</u>		
CINNAMIQUE	+	+
p-COUMARIQUE	+	+
CAFEIQUE	+	-
FERULIQUE	+	+
<u>Série benzoïque</u>		
BENZOIQUE	+	+
SALICYLIQUE	+	+
p-HYDROXYBENZOIQUE	+	+
GENTISIQUE	+	+
PROTocatechique	+	-
3,5-DIHYDROXYBENZOIQUE	-	-
GALLIQUE	+	+
VANILLIQUE	+	+
SYRINGIQUE	+	+
ELLAGIQUE	-	+

b - Les acides cinnamiques - On peut relever dans les feuilles de Chêne la présence des acides cinnamique, p-coumarique, caféique et férulique. Alors que les acides hydroxylés sont de répartition très générale chez les végétaux (BATE-SMITH, 1956) l'acide cinnamique lui-même n'a que très rarement été identifié (comme pour l'acide benzoïque en effet sa révélation est difficile).

L'acide sinapique n'a pu être détecté chez le Chêne. Ce résultat semble aller dans le sens des hypothèses émises par BATE-SMITH (1956) et HARBORNE et SIMMONDS (1964) ; selon ces auteurs en effet, l'acide sinapique serait inexistant parmi les Dicotylédones arborescentes et caractéristique de "l'état herbacé".

Enfin, on ne peut conclure de façon absolue à l'absence de l'acide o-coumarique, ce composé se cyclisant très facilement en coumarine*.

* MIQUEL J.F. (1974) - Communication personnelle.

2.- Autres structures benzéniques

Les séparations obtenues à partir d'hydrolysats de feuilles de Chêne font apparaître, à côté des acides phénoliques les plus couramment rencontrés chez les végétaux, la présence de substances dont la position (ou la révélation) ne correspond à aucun des 21 témoins retenus (voir carte témoin). La figure 5 donne la position de ces composés par rapport à l'acide p-hydroxybenzoïque et le tableau XIII leur répartition dans les feuilles jeunes et âgées.

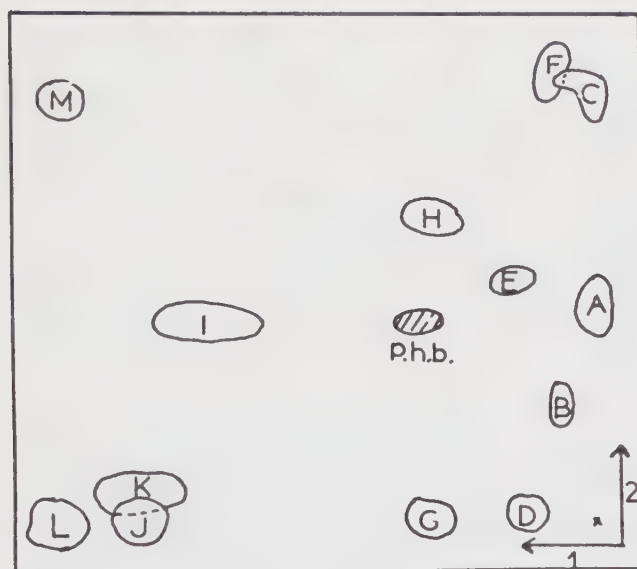


Figure 5 - Position en chromatographie-électrophorèse des composés "inconnus".

p-HB = acide p-hydroxybenzoïque

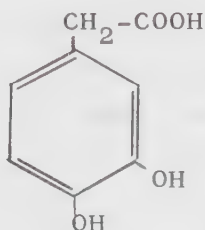
1 = chromatographie

2 = électrophorèse

J'ai pu identifier deux d'entre eux : les composés A et C ; il s'agit respectivement des acides homoprotocatéchique et phtalique (ALIBERT, 1968 ; MARIGO et ALIBERT, 1969).

L'acide homoprotocatéchique (3,4-dihydroxyphénylacétique*) appartient à la série phényl acétique (C_6-C_2) et n'a jusqu'ici été mis en évidence que chez les levures (HARBORNE et SIMMONDS, 1964) et quelques Saxifragacées du genre Astilbe (KINDL, 1969). Cette série

* Acide homoprotocatéchique :



phénolique reste peu connue chez les végétaux, sans doute en raison d'une répartition plus restreinte que celles en C_6-C_1 et C_6-C_3 .

TABLEAU XIII

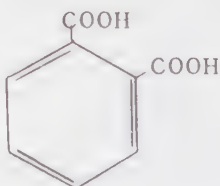
Les composés de nature indéterminée chez Quercus pedunculata

Composés (voir fig. 13)	Feuilles jeunes	Feuilles âgées
A	-	+
B	-	+
C	+	-
D	-	+
E	+	-
F	+	-
G	-	+
H	+	+
I	+	-
J	-	+
K	+	+
L	-	+
M	+	+

L'acide phtalique (benzène 1,2-dicarboxylique*) détecté pour la première fois par SCHMID et KARRER (1945) chez Papaver somniferum a été caractérisé chez un nombre peu important d'espèces végétales. MARIGO (1971) a montré chez Quercus pedunculata que cet acide pouvait former une liaison ester avec l'acide quinique et qu'il était synthétisé par condensation de trois unités acétate.

La caractérisation de ces deux composés souligne la présence chez le Chêne, à côté des structures les plus connues (acides cinamiques et benzoïques) d'autres acides simples à noyau benzénique, et laisse entrevoir la très grande complexité du contenu aromatique du végétal.

* Acide phtalique :



L'identification des autres substances n'a pu être menée à terme en raison de leur instabilité. Certaines d'entre elles doivent probablement correspondre à la dégradation de structures naturelles engendrée par les opérations d'extraction et de purification.

II.- ETAT NATUREL DES ACIDES PHENOLIQUES

Le protocole d'extraction et de purification permet d'obtenir à partir du matériel végétal :

- les formes solubles divisées en fractions "tannins" et "non tannins"
- un résidu insoluble

j'ai recherché la présence des acides phénoliques dans ces fractions chacune d'entre elles pouvant correspondre à une forme d'existence naturelle des acides phénols.

1.- Les formes solubles

a - La fraction "non tannins" - Le tableau XIV indique que les acides phénols de l'extrait soluble "non tannins" se présentent sous forme libre, ou engagés dans des combinaisons.

• Les formes libres - Chez le Chêne, seuls les acides 3,5-dihydroxybenzoïque, gallique et ellagique se retrouvent dans la fraction non hydrolysée, donc à l'état libre (cette forme d'existence étant semble-t-il assez générale pour l'acide ellagique chez les Fagales (WILLIS, 1931)).

A la suite de travaux récents (FRITIG et al., 1970 ; Van SUMERE et al., 1972) il semblerait cependant que tous les acides phénoliques puissent exister sous la forme libre mais à des concentrations extrêmement faibles ; il serait alors le plus souvent impossible de les mettre en évidence à l'aide des révélateurs chromatographiques usuels.

• Les formes combinées - Compte tenu de leur spécificité relative les hydrolyses réalisées sur les extraits "non tannins" (tableau XIV) indiquent que les termes en C_6-C_3 se présentent préférentiellement dans la plante sous forme d'esters (l'acide p-coumarique étant seul libéré par l'hydrolyse acide) alors que les composés en C_6-C_1 sont présents aussi bien sous forme esters qu'éther-oxydes. D'autre part, certaines combinaisons sont hydrolysées par la β -glucosidase et font donc intervenir des liaisons avec le glucose. De ce point de vue la situation chez le Chêne est donc

TABLEAU XIV

Les acides phénoliques solubles, fraction "non tannins"

Organes	Feuilles jeunes				Feuilles âgées			
	non hydrol	acide	enzym. (gluc)	alcaline	non hydrol.	acide	enzym. (gluc)	alcaline
Hydrolyses								
CINNAMIQUE		?	?	+		?	?	.
p-COUMARIQUE		t	t	+		t	t	.
CAFEIQUE				+				
FERULIQUE				+				.
BENZOIQUE								
SALICYLIQUE		?				?	?	.
p-HYDROXYBENZOIQUE		+				.	.	.
PROTOCATECHIQUE		+				.	.	.
3,5-DIHYDROXYBENZOIQUE		+				.	.	.
GENTISIQUE		+				.	.	.
GALLIQUE	+	+	+	+		.	.	.
VANILLIQUE		+	t			.	.	.
SYRINGIQUE		t				.	.	.
ELLAGIQUE	+	+	+	+	+	.	.	.

gluc = β -glucosidase
t = traces

comparable à celle d'autres végétaux (Van SUMERE et al., 1957 ; CORNER et HARBORNE, 1960 ; WATANABE et al., 1964). En revanche, il nous a été impossible d'identifier l'acide chlorogénique, ester de l'acide caféique et de l'acide quinique (BOUDET et al., 1967 a). Ce caractère paraît remarquable quand on connaît la répartition très générale de ce depside (SONDHEIMER, 1958) et l'abondance de l'acide quinique dans tous les organes du Chêne (BOUDET, 1972). La liaison ester mise en évidence pour l'acide caféique (tableau XIV) doit donc faire appel à des composés autres que l'acide quinique, sans doute le glucose (HARBORNE et CORNER, 1960) ou certains acides organiques (RIBEREAU-GAYON, 1965 ; TANGUY et MARTIN, 1972).

b - Les acides phénoliques de la fraction "tannins" -
Au niveau des tannins, seule l'hydrolyse acide a été appliquée le tableau XV indique la nature des composés libérés dans ces conditions.

TABLEAU XV

Acides phénoliques de la fraction "tannins"

Acides phénoliques	Feuilles jeunes	Feuilles âgées
Ac. GALLIQUE	+	+
Ac. ELLAGIQUE	+	+
Ac. PROTOCATECHIQUE	+	+
Ac. p-HYDROXYBEN- ZOIQUE	+	+
Ac. GENTISIQUE		+
Ac. VANILLIQUE		+
Ac. SYRINGIQUE		+

En plus des acides gallique et ellagique, classiquement constitutifs des tannins hydrolysables du Chêne (BOUDET, 1965), on remarque la présence d'un certain nombre d'acides phénoliques de la série benzoïque exclusivement.

Ces résultats confirment ceux précédemment obtenus par RUSSEL (1935), WHITE (1957) et FEENY et BOSTOCK (1968) qui mentionnaient l'existence de phénols simples autres que les acides gallique et ellagique dans les fractions tannins isolées de divers végétaux.

On ne peut que s'interroger sur le rôle exact de ces acides liés aux tannins. Font-ils partie intégrante des molécules tan-nantes ou au contraire cette liaison n'est-elle que temporaire et fonction de certaines situations métaboliques ou physiologiques du végétal ?

Des études mettant en jeu des molécules marquées pourraient peut-être apporter quelques indications sur le "turnover" de ces formes naturelles des acides phénols.

2.- Les formes insolubles des acides phénoliques

a - Mise en évidence - L'hydrolyse acide ou alcaline du résidu d'extraction conduit aux résultats présentés dans le ta-bleau XVI.

TABLEAU XVI

Les acides phénoliques sous forme insoluble chez
Quercus pedunculata

Organes	Feuilles jeunes		Feuilles âgées	
Hydrolyses	Acide	Alcaline	Acide	Alcaline
<u>Acides phénoliques</u>				
p-COUMARIQUE			+	+
p-HYDROXYBENZOIQUE			+	+
PROTOCATECHIQUE			+	
GENTISIQUE			+	
GALLIQUE	+	+		
VANILLIQUE			+	t
SYRINGIQUE			t	
ELLAGIQUE	+	+	+	+

t = traces

Chez Quercus pedunculata les acides phénoliques existent donc également sous forme de combinaisons insolubles ; la diversité des solvants retenus ainsi que les modalités d'extraction choisies dans ce travail apportent la preuve de la réelle insolubilité de ces structures.

Je me suis interrogé sur la nature de ces combinaisons : après l'extraction, le résidu insoluble doit être composé, en grande partie, par des parois cellulaires et des protéines inso-lubles (ou insolubilisées par les solvants organiques). J'ai donc

tenté d'apporter quelques arguments en faveur d'une liaison acides phénols - protéines.

b - Présence d'acides phénoliques liés aux protéines dans les feuilles de Chêne - Isolement d'une fraction protéique : On broie les feuilles dans un milieu d'extraction constitué de tampon phosphate 0,1 M de pH 7,5 contenant 1 % de Tween* et 1 % de PEG** (PM = 6000). On centrifuge 15 minutes à 18 000 x g puis on élimine les substances de faible poids moléculaire par filtration sur gel de Sephadex G 50 (colonne 25 x 5 cm) équilibré dans du tampon phosphate M/200 de pH 7,5 puis on précipite les protéines en amenant le filtrat à 50 % en sulfate d'ammonium. Après centrifugation, le culot est repris par de l'eau distillée et hydrolysé par l'acide ou l'alcali.

- Mise en évidence d'acides phénoliques liés aux protéines : Le tableau XVII rassemble les résultats des analyses aux deux stades de végétation retenus (ALIBERT et al., 1968) : on constate que de nombreux acides phénoliques se retrouvent dans les fractions

TABLEAU XVII

Acides phénoliques libérés par hydrolyses acide et alcaline des fractions protéiques obtenues à partir des feuilles de Chêne

Organes	Feuilles jeunes		Feuilles âgées	
Hydrolyses	Acide	Alcaline	Acide	Alcaline
<u>Acides phénoliques</u>				
p-COUMARIQUE	+	+	+	+
p-HYDROXYBENZOIQUE	+	+	+	+
PROTOCATECHIQUE	+	+	+	+
GENTISIQUE	-	-	+	-
VANILLIQUE	+	+	-	-
GALLIQUE	+	+	+	+
ELLAGIQUE	+	+	+	+

Remarque : Les fractions protéiques sont nettement plus riches en acides phénols que les résidus d'extraction. Un certain nombre de ces combinaisons doit donc être solubilisé par le solvant aqueux lors de l'épuisement en continu du matériel végétal (voir page 44).

* Le Tween, agent tensioactif permet une meilleure solubilisation des protéines.

** Le PEG se lie aux composés phénoliques pour former des combinaisons insolubles, facilement éliminables par centrifugation.

protéiques isolées, l'acide p-coumarique étant le seul composé de la série cinnamique*.

Tous les acides phénoliques, à l'exception de l'acide gentisique sont libérés aussi bien par l'hydrolyse acide que par l'alcali ce qui apporte peu d'indications sur le mode de liaisons entre les fractions phénoliques et protéiques. Deux cas peuvent être envisagés :

- Les acides phénols pourraient être liés aux protéines tels quels, par l'intermédiaire des groupements phénoliques ou carboxyliques des acides phénols et -COOH ou NH_2 des acides aminés protéiques. Ainsi Van SUMERE et al. (1973) ont mis en évidence dans les protéines de l'Orge des séquences N-féruloyl-l-phénylalanine.

- La liaison avec les protéines pourrait se faire non pas avec les acides phénols libres mais avec leurs formes combinées : WRIGHT et al. (1960), JACOBSON (1961), WRIGHT (1962) et LOCHE (1966) ont démontré en effet chez le Tabac l'existence de complexes acide chlorogénique - protéines.

Dans l'état actuel des recherches il est impossible de conclure chez le Chêne en faveur de l'un ou l'autre type de liaisons.

Quel peut être le rôle de ces structures chez les végétaux ?

Selon EL BASYOUNI et TOWERS (1964) EL BASYOUNI et al. (1964 a) puis EL BASYOUNI et NEISH (1966) elles pourraient avoir une activité métabolique ; mais cette hypothèse a été réfutée par TAYLOR et ZUCKER (1966) puis FRITIG et al. (1970). FAUSCH et al. (1963) pensent plutôt à un mécanisme de détoxification pour la plante. Enfin, Van SUMERE et al. (1973) n'excluent pas la possibilité d'une intervention spécifique au niveau de la synthèse protéique : ces auteurs font remarquer en effet la similitude qui existe entre les séquences N-féruloyl-l-phénylalanine identifiées chez l'Orge et N-formyl-méthionine initiatrices de la synthèse protéique chez Escherichia coli (ADAMS et CAPECCHI, 1966 ; WEBSTER et al., 1966).

* Il est peu probable que les acides phénols identifiés dans la fraction protéique soient le résultat d'une liaison secondaire au cours de l'extraction ou de la purification : plusieurs acides existant sous forme de combinaisons esters et éther-oxydes solubles (tableau XIV) ne se retrouvant pas au niveau des protéines (acides caféique, férulique, salicylique, 3,5-dihydroxybenzoïque et syringique).

III.- CONCLUSIONS

Au cours de ce premier travail analytique j'ai pu identifier les acides phénoliques présents chez le Chêne et déterminer leur forme d'existence naturelle.

Ce végétal s'est révélé particulièrement riche en unités phénoliques simples : acides benzoïques, cinnamiques mais aussi composés du type phénylacétique et phtalique.

Parmi ces substances les acides en C_6-C_{11} se distinguent par leur diversité et leur abondance : presque tous les termes de cette série sont représentés ce qui laisse supposer une orientation préférentielle du métabolisme du Chêne vers la synthèse d'unités de ce type.

Comme chez les autres végétaux, la plupart des acides phénols ne sont pas identifiables à l'état libre. Ils entrent plutôt dans la constitution d'un grand nombre de combinaisons solubles simples comme des esters et des éther-oxydes, ou complexes comme les tannins.

Le Chêne contient en outre des acides phénoliques liés à des structures totalement insolubles dans une large gamme de solvants, une partie de ces formes correspondant à des complexes avec les protéines.

CHAPITRE III

VARIATIONS QUANTITATIVES DES ACIDES PHENOLIQUES AU COURS DE LA GERMINATION PUIS DE LA CROISSANCE DE LA RACINE CHEZ *Quercus pedunculata* (Ehrh.)

I.- CARACTERES GENERAUX DES VARIATIONS DES ACIDES PHENOLIQUES

- 1.- Importance des acides phénoliques
- 2.- Niveau d'accumulation comparé des acides phénols
- 3.- Variations quantitatives des acides phénoliques

II.- ACIDES PHENOLIQUES ET MORPHOGENESE

- 1.- Rappels sur le rôle régulateur des acides phénols dans la morphogénèse
- 2.- Corrélations entre les variations des acides phénoliques et la morphogénèse chez le Chêne

III.- CONCLUSIONS

CHAPITRE III

VARIATIONS QUANTITATIVES DES ACIDES PHENOLIQUES AU COURS DE LA GERMINATION PUIS DE LA CROISSANCE DE LA RACINE CHEZ Quercus pedunculata (Ehrh.)

Malgré leur rôle de précurseur général des substances à noyau aromatique et les nombreuses études effectuées in vitro montrant leur action sur divers phénomènes physiologiques, on ne possède encore aujourd'hui que peu de données sur le comportement quantitatif des acides phénoliques au cours de la vie des plantes. Les travaux les plus importants effectués en ce sens concernent la germination chez le Blé (EL BASYOUNI et TOWERS, 1964) l'Orge et la Laitue (Van SUMERE et al., 1972), les fluctuations journalières et annuelles de l'acide chlorogénique chez divers végétaux (URBAN, 1959) ou encore l'évolution de quelques uns de ces acides en fonction du développement et du degré de maturité du fruit chez le Citronnier (DAS et al., 1967).

En raison des difficultés de séparation et de dosage de ces substances, seuls quelques acides sont le plus souvent considérés et il n'est à aucun moment possible de se faire une idée générale des fluctuations d'ensemble qui affectent le végétal au cours du phénomène physiologique considéré.

J'ai suivi les variations quantitatives des acides phénoliques au cours de la germination chez le Chêne : les résultats de ces déterminations sont mentionnés dans les tableaux XVIII (teneurs en acides phénols), et XIX (quantités d'acides phénols). J'analyserai tout d'abord les caractères généraux de ces variations puis j'étudierai plus en détail les corrélations qui peuvent exister entre les modifications du contenu phénolique du végétal et la germination.

TABLEAU XVIII

Variations quantitatives des acides phénoliques au cours de la germination chez *Quercus pedunculata*
(teneurs en acides phénols)

Cotylédons	µg par gramme de végétal sec										
	CINN.	p-COU.	CAFEI.	FER.	BENZ.	SAL.	GENT.	p-HB.	PROT.	VAN.	GALL.
Stades 1	2,8	-	-	+	10,7	-	-	30	-	+	6 875
2	27,8	-	-	+	92,5	-	-	248	-	+	1 410
3	5,5	-	-	-	12,8	-	-	25	-	4	1 987
4	12	+	-	-	4,9	-	-	20	-	3,5	4 619
5	2	-	-	+	4,7	-	-	34	-	3,4	4 081
6	3,1	-	-	3,3	2,5	-	-	22	-	4,9	3 867
7	5,2	-	+	5,6	1,9	-	-	64	-	6,5	3 812

Tableau XVIII a - Au niveau des cotylédons.

Racines	µg par gramme de végétal sec										
	CINN.	p-COU.	CAFEI.	FER.	BENZ.	SAL.	GENT.	p-HB.	PROT.	VAN.	GALL.
Stades 1	3,7	7,4	+	+	16,8	+	+	22	+	+	3 070
2	10,9	1,6	+	+	29,3	+	+	28	+	+	3 921
3	11,4	6,1	+	+	30,7	+	+	88	+	+	2 907
4	5	13,1	+	+	14,6	+	6,3	13	8	4	1 189
5	2,6	3,6	+	+	11,5	+	4	28	+	4,4	223
6	3,8	15,7	+	+	9,4	+	+	2	+	1,7	1 023
Racines + Tiges	2,9	8,8	+	+	9,3	+	+	18	+	+	749
Racines 7	1,9	9,8	+	+	6,7	+	+	2	+	+	597
Tiges 7	5,8	6,1	+	+	16,5	+	+	11	+	+	893

Tableau XVIII b - Au niveau des racines.

I.- CARACTERES GENERAUX DES VARIATIONS DES ACIDES PHENOLIQUES

Trois idées générales se dégagent de ces données, elles concernent :

- l'importance relative des acides phénols par rapport aux autres constituants organiques du végétal,
- le niveau d'accumulation comparé de ces substances,
- leurs variations quantitatives.

1.- Importance des acides phénoliques

Quantitativement les esters des acides phénoliques ne constituent qu'une faible partie des substances organiques du végétal : quelques microgrammes par gramme de matériel végétal sec. Seul l'acide gallique est présent dans tous les organes en quantités importantes et comparables par exemple à celles des acides aminés libres (GADAL, 1970).

Ces teneurs extrêmement faibles en acides phénols semblent assez générales puisque sensiblement du même ordre de grandeur chez le Blé et l'Orge (EL BASYOUNI et TOWERS, 1964 ; Van SUMERE et al., 1972). Elles pourraient être liées à leur toxicité (STOLL et al., 1950) ou, pour certains de ces composés, à un rôle d'intermédiaires rapidement utilisés dans la biosynthèse d'unités phénoliques plus complexes.

2.- Niveau d'accumulation comparé des acides phénols

Plusieurs remarques peuvent être faites à ce sujet :

- l'acide gallique est à tous les niveaux le composé prédominant, l'importance quantitative de ce composé peut être mise en relation avec l'abondance des acides quinique et shikimique chez le Chêne (BOUDET, 1972) précurseurs à partir desquels ce composé se forme directement (MARIGO et al., 1969 ; BOUDET, 1972). Par ailleurs, le genre Quercus semble présenter une orientation très nette du métabolisme vers la synthèse de structures condensées de l'acide gallique comme l'acide ellagique ou les tannins hydrolysables (voir chapitre II et BOUDET, 1965 - ALIBERT, 1968).

- l'acide syringique se retrouve en quantités importantes uniquement au niveau des racines où il s'accumule au cours de la germination (tableau XIX). Selon certains auteurs, cet acide proviendrait soit de l'acide sinapique (ZENK, 1966), absent chez le Chêne, soit de l'acide vanillique dont les variations ici paraissent totalement indépendantes de celles de ce composé (voir deuxième partie). L'origine, mais aussi le devenir et la signification du comportement particulier de l'acide syringique dans les racines du Chêne restent donc à préciser.

TABLEAU XIX

Variations quantitatives des acides phénoliques au cours de la germination chez *Quereus pedunculata*
(quantités d'acides phénols)

Cotylédons	nanomoles par organe										
	CINN.	p-COU.	CAFEI.	FER.	BENZ.	SAL.	GENT.	p-HB	PROT.	VAN.	SYR. GALL.
Stades 1	40	-	+	+	184	-	-	46	-	+	76 180
2	367	-	+	+	1 514	-	-	3 600	-	+	15 000
3	64	-	+	+	182	-	-	325	-	41	18 210
4	142	+	+	+	70	-	-	259	-	46	43 100
5	24	+	+	+	67	-	-	429	-	34	37 420
6	30	+	+	24	29	-	-	227	-	41	29 380
7	47	+	+	29	21	-	-	638	-	54	27 780

Tableau XIX a - Au niveau des cotylédons.

Racines	nanomoles par organe										
	CINN.	p-COU.	CAFEI.	FER.	BENZ.	SAL.	GENT.	p-HB	PROT.	VAN.	SYR. GALL.
Stades 1	0,06	0,10	+	+	0,33	+	+	0,38	+	+	0,01 39
2	0,26	0,04	+	+	0,86	+	+	0,74	+	+	0,05 75
3	1,50	0,74	+	+	5,04	+	+	12,70	+	+	2,50 309
4	1,14	2,64	+	+	3,96	+	1,35	3,13	1,60	0,79	6,80 209
5	0,74	0,90	+	+	3,85	+	1,10	8,20	+	1,10	18,40 49
6	2,80	10,27	+	+	8,23	+	+	1,82	+	1,07	108,40 582
Racines + tiges	1,77	4,78	+	+	6,77	+	+	3,01	+	+	80,70 353
Racines 7	0,85	3,90	+	+	3,60	+	+	1,10	+	+	77,50 241
Tiges 7	0,92	0,88	+	+	3,17	+	+	1,91	+	+	3,20 112

Tableau XIX b - Au niveau des racines.

- enfin, pour tous les stades, on constate une prédominance qualitative et quantitative des acides de la série benzoïque sur ceux de la série cinnamique. De ce point de vue la situation chez le Chêne semble différente de celle des autres végétaux examinés à ce jour (DAS et al., 1967 ; EL BASYOUNI et TOWERS, 1964 ; Van SUMERE et al., 1972) pour lesquels les acides en C_6-C_3 (acides p-coumarique et férulique) restent à tout moment les composés les plus abondants.

3.- Variations quantitatives des acides phénoliques

L'un des résultats les plus intéressants de cette étude est la mise en évidence de variations très importantes des acides phénoliques au cours de la formation des jeunes plants de Chêne. Cet "état dynamique" avait déjà été signalé pour les acides en C_6-C_3 par URBAN (1959), DAS et al. (1967), EL BASYOUNI et TOWERS (1964) et Van SUMERE et al. (1972). Les résultats obtenus ici apportent la preuve de fluctuations semblables au niveau des acides de la série benzoïque. Selon EL BASYOUNI et TOWERS (1964), les variations qui affectent les acides de la série cinnamique doivent être mises en relation avec leur rôle de précurseurs immédiats des lignines. Il est plus difficile en revanche, d'attribuer un rôle bien défini aux changements qui se produisent pour les acides benzoïques.

J'ai analysé plus en détail le comportement des acides phénols au cours de la formation des jeunes plants de Chêne et j'ai recherché s'il était possible de relier les variations les plus caractéristiques de certains d'entre eux à des étapes particulières du développement du végétal.

II.- ACIDES PHENOLIQUES ET MORPHOGENESE

Divers travaux réalisés ces dernières années ont suggéré l'intervention des acides phénoliques dans la régulation de la morphogénèse chez les végétaux ; je rappellerai tout d'abord l'essentiel des résultats obtenus dans ce domaine.

1.- Rappels sur le rôle régulateur des acides phénols dans la morphogénèse

Les études sur le rôle régulateur des acides phénoliques dans la morphogénèse ont débuté à la suite des travaux initiaux de BONNER et GALSTON en 1944 qui montrèrent que l'acide cinnamique isolé des racines de Guayule était un inhibiteur de croissance

efficace. Par la suite, de nombreux travaux, conduits pour la plupart in vitro, permettaient d'attribuer aux autres acides de la série cinnamique, mais également à un certain nombre de composés de la série benzoïque, une activité régulatrice dans divers domaines morphogénétiques.

On a montré en effet que les acides phénoliques étaient des inhibiteurs ou des activateurs de la germination (de ROUBAIX et LAZAR, 1960 ; Van SUMERE, 1960 ; MAYER et POLJAKOFF-MAYBER, 1963 ; Van SUMERE et al., 1972), de la néoformation des racines sur les tiges coupées (BASTIN, 1966 a et b) ; VIEITEZ et al., 1966), de l'élongation des tiges et des racines (NITSCH et NITSCH, 1962 ; PILET, 1966 ; GESTO et al., 1967 ; VIEITEZ et al., 1967) ou encore de la formation des bourgeons végétatifs et floraux (BOUILLENNE-WALRAND, 1966 ; NITSCH, 1966 ; PAULET, 1966 ; PAULET et LIORET, 1966 ; PRYCE, 1972).

Les mécanismes par lesquels les acides phénols sont susceptibles d'agir sur ces phénomènes physiologiques restent encore obscurs, on a pu cependant mettre en évidence une action possible à deux niveaux :

- au niveau hormonal
- au niveau des processus métaboliques fondamentaux.

D'un point de vue hormonal, les acides phénols pourraient intervenir dans la dégradation de l'auxine par l'intermédiaire de l'AIA-oxydase (RABIN et KLEIN, 1957 ; GORTNER et KENT, 1958 ; ZENK et MULLER, 1963). Cette activité se caractérise par un effet différent au niveau de l'enzyme selon que l'on a affaire à un p-monophénol ou à un o-diphénol : les premiers sont des cofacteurs dans l'oxydation enzymatique de l'AIA et de ce fait apparaissent comme antagonistes de l'auxine ; les seconds, au contraire, inhibiteurs de l'AIA-oxydase, sont des synergistes de l'hormone (NITSCH et NITSCH, 1962 ; TOMASZEWSKI, 1964).

Par ailleurs, les acides phénols peuvent avoir une influence sur le taux intracellulaire d'AIA en entrant en compétition pour sa synthèse au niveau de précurseurs communs comme l'acide chorismique par exemple (la voie de l'acide shikimique étant en partie commune à l'hormone et aux inhibiteurs, KEFELI et KADYROV, 1971).

D'un point de vue métabolique, les données sont moins nombreuses. Cependant, dès 1962 NAGUIB montrait que l'acide benzoïque et ses dérivés pouvaient intervenir dans des processus liés à la respiration chez l'Orge. Van SUMERE et son équipe démontraient



Figure 6 - Mise en évidence des variations caractéristiques des acides p-hydroxybenzoïque et gallique en fonction des stades de développement des jeunes plants de Chêne.

Ces données ont été obtenues à partir des tableaux XIX a et b. La valeur 100 est attribuée à la quantité la plus élevée atteinte par un acide, dans un organe donné, au cours des sept stades retenus.

ensuite qu'il en était de même pour de nombreux autres acides phénoliques chez les chlorelles (DEDONDER et Van SUMERE, 1971), les levures et les laitues (Van SUMERE et al., 1972).

Récemment, KÖVES et al. (1972) puis Van SUMERE et al. (1972) indiquaient que ces acides pouvaient modifier la synthèse protéique. Selon GLASS (1973) ils peuvent également agir sur la perméabilité membranaire et MICHNIEWICZ et ROŻEJ (1974) attribuent à l'acide férulique un rôle dans la transpiration et l'ouverture des stomates chez les végétaux.

Très schématiquement il semble que tant sur le plan hormonal que métabolique, les para-mono-phénols soient activateurs et les ortho-diphénols et leurs dérivés méthylés, inhibiteurs.

Il est possible que dans des phénomènes comme l'élongation des racines, tiges et bourgeons, pour lesquels le rôle de l'auxine est indubitable (THIMANN, 1936), le contrôle par les acides phénols doit s'exercer via l'AIA-oxydase. Il n'en est pas de même par exemple pour la germination (MAYER et POLJAKOFF-MAYBER, 1963) et la néoformation des racines sur les boutures (VIEITEZ et al., 1966 ; BASU et al., 1969 ; ROY et al., 1972) où l'intervention de cette hormone n'est pas prouvée. Une action au niveau du métabolisme fondamental paraît ici plus probable.

2.- Corrélations entre les variations des acides phénoliques et la morphogénèse chez le Chêne

Les résultats mentionnés dans les tableaux XIX a et b indiquent une prépondérance très nette des acides p-hydroxybenzoïque et gallique sur les autres acides phénols. Les "pools" de ces deux acides présentent un "état dynamique" remarquable et possèdent par ailleurs la structure chimique des activateurs et inhibiteurs envisagés précédemment. J'ai donc particulièrement suivi les fluctuations de ces acides en fonction des différents stades de développement du végétal. Il apparaît que les modifications les plus importantes du "pool" des acides p-hydroxybenzoïque et gallique (figure 6) correspondent à des étapes bien précises : imbibition (stades 1 à 2), émergence de la racicule (stade 2 à 3) et de la gemmule (stades 5 à 6). Dans tous les cas les variations de ces composés, dans un organe donné, s'effectuent en sens inverse.

En suivant l'évolution du rapport p-hydroxybenzoïque/gallique (p-HB/G) (tableau XX) on peut noter que les fortes teneurs en acide gallique par rapport à l'acide p-hydroxybenzoïque ($p\text{-HB/G} < 1$)

TABLEAU XX

Variations du rapport p-hydroxybenzoïque (p-HB/G), dans les cotylédons et les racines
en fonction des stades de développement des jeunes plants de Chêne

Organes	p-hydroxybenzoïque/gallique x 10 ⁻³						
	<u>0,6</u>	<u>240</u>	17	6	11	8	26
Cotylédons							
Racines	10	10	42	14	<u>170</u>	3	5
Tiges							17
Stades	1 	2 	3 	4 	5 	6 	7 

correspondent au gland au repos*. Les valeurs élevées en acide p-HB précèdent toujours, au contraire, une étape nouvelle de la morphogénèse (stades 3 et 6). Enfin, les stades pour lesquels aucun évènement ne se produit sont caractérisés, quant à eux, par une valeur moyenne du rapport ($10 < p\text{-HB}/G < 40$) comparable dans les cotylédons et les racines.

Les équilibres en faveur de l'acide gallique semblent donc correspondre à des phases de faible activité métabolique et morphogénétique, les rapports favorables à l'acide p-hydroxybenzoïque paraissent à l'inverse, liés à la reprise du métabolisme et à une morphogénèse intense. En ce sens, ces données rejoignent celles énoncées précédemment concernant les actions spécifiques des mono et des polyphénols sur les phénomènes physiologiques, mises en évidence in vitro.

Il apparaît difficile, après ces toutes premières études de déterminer la nature des mécanismes biochimiques responsables de l'activité physiologique des acides phénoliques. Des recherches comparables devront d'abord être entreprises afin d'apprécier la généralité du comportement de ces substances au cours de la morphogénèse. Il est d'ailleurs probable que cette propriété ne soit pas seulement le fait des acides p-hydroxybenzoïque et gallique, mais que, selon le végétal ou même le type d'organe envisagé, d'autres acides puissent également jouer un rôle régulateur. De ce point de vue, des publications récentes de PLOTNIKOVA et RUNKOVA (1973) et de MACHEIX (1974) indiquent par exemple que les esters quiniques des acides p-coumarique et caféique semblent devoir participer activement à la régulation de la croissance des fruits.

III.- CONCLUSIONS

L'étude précédente révèle donc l'existence de corrélations entre les variations de deux acides phénols et certaines étapes de la germination et de la croissance de la racine chez le Chêne.

Ces constatations réalisées sur le matériel in vivo rejoignent sur certains points les résultats obtenus in vitro par de nombreux auteurs concernant le rôle des acides phénols dans la

* Chez le Chêne, la semence peut germer dès sa chute de l'arbre (Woody plant seed manual, prepared by the forest service US department of Agriculture, 1968, miscellaneous publication N° 654).

morphogénèse. Les approches in vitro sont critiquables : elles sont pour la plupart réalisées par apport exogène des acides phénoliques et divers facteurs comme la pénétration dans les cellules des substances fournies, la forme réellement active de ces composés (libres, estérifiés, etc...) ou encore les traumatismes engendrés par des concentrations locales élevées en molécules souvent toxiques, ne sont jamais contrôlables. Les résultats obtenus au cours de cette étude représentent une autre façon d'aborder le problème et, s'ils ne peuvent être sujets à ces dernières critiques, ils ne doivent pas être présentés sans réserves. En effet, seuls les esters ont été étudiés et les variations enregistrées ne sont qu'une appréciation globale qui ne tient pas compte des effets de compartimentation cellulaire ou métabolique, peut-être à l'origine de "pools" physiologiquement actifs ou inactifs des acides phénols. Cette approche devrait cependant dans tous les cas précéder l'étude in vitro pour indiquer à l'expérimentateur la nature des composés susceptibles d'avoir un rôle actif dans le phénomène morphogénétique étudié, la concentration de ces substances in vivo, ainsi que les stades de développement pour lesquels les effets des apports exogènes pourraient être les plus significatifs.

x

x

x

Ce premier travail analytique a permis de reconnaître tout d'abord les principaux acides phénoliques présents chez le Chêne et leur état d'existence naturel. Il met également l'accent sur la complexité du contenu phénolique de ce végétal et la prédominance des structures polyhydroxylées du type benzoïque.

D'autre part, une méthode d'étude quantitative des acides phénols a été décrite et son applicabilité aux végétaux démontrée. Les premiers résultats obtenus par la mise en oeuvre de cette technique mettent en évidence un état dynamique des acides phénols qui pourrait être mis en relation avec leur position d'intermédiaires métaboliques dans la biosynthèse d'unités phénoliques plus complexes. D'autre part, la recherche de corrélations entre

les variations quantitatives de certains acides phénoliques et les phénomènes qui président à la germination chez le Chêne, s'est avérée prometteuse. Elle prélude à une étude systématique du comportement de ces composés au cours des différents évènements morphogénétiques de la vie des plantes.

DEUXIEME PARTIE

=====

LES PRINCIPALES VOIES DE BIOSYNTHESE DES ACIDES PHENOLIQUES
ET LEUR REGULATION CHEZ Quercus pedunculata

INTRODUCTION

CHAPITRE I.- MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II.- LES VOIES DE BIOSYNTHESE DES ACIDES PHENOLIQUES CHEZ
Quercus pedunculata (Ehrh.)

CHAPITRE III.- SUR QUELQUES ENZYMES DU METABOLISME DES ACIDES PHE-
NOLIQUES CHEZ Quercus pedunculata (Ehrh.)

CHAPITRE IV.- REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES ACIDES PHENOLIQUES

INTRODUCTION

Les premières études sur l'origine métabolique des acides phénoliques* ont initialement concerné les termes de la série cinnamique. Dès 1957, GEISSMAN et SWAIN constataient chez Nicotiana tabacum l'incorporation de la phénylalanine ^{14}C dans l'acide caféique. Cependant, dans ce domaine, les travaux les plus déterminants étaient effectués par Mac CALLA et NEISH chez Salvia splendens. Ces auteurs apportaient les premiers éléments sur l'existence de la voie de l'acide shikimique chez les végétaux (Mac CALLA et NEISH, 1959 a), puis l'intervention des acides aminés aromatiques dans la biosynthèse des acides cinnamiques. Ils proposaient enfin une filiation pour les différents termes de cette série (1959 b).

Par la suite, les chercheurs se sont surtout attachés à confirmer les résultats de Mac CALLA et NEISH par l'étude des enzymes catalysant ces diverses réactions. Ainsi étaient successivement mises en évidence la phénylalanine ammonia-lyase (KOUKOL et CONN, 1961), la tyrosine ammonia-lyase (NEISH, 1961), la caféoyl-O-méthyltransférase (FINKLE et NELSON, 1963) et la cinnamate-4-hydroxylase (NAIR et VINNING, 1965). L'existence d'une coumarique-hydroxylase spécifique n'a encore pu être démontrée irréfutablement et on admet généralement que la réaction acide p-coumarique $\longrightarrow$ acide caféique s'effectue sous l'action des phénolases (LEVY et ZUCKER, 1960 ; VAUGHAN et BUTT, 1969).

Le problème de la formation des unités en $\text{C}_6\text{-C}_1$ a été abordé un peu plus tard ; pourtant dès 1952 GEISSMAN et HINREINER indiquaient que ces composés devaient dériver d'unités phénylpropa-noïques par perte de deux atomes de carbone de la chaîne latérale. KINDL et BILLEK (1962) puis GRISEBACH et VOLLMER (1963), ZENK et MULLER (1964) et ZENK (1966) apportaient ensuite une série d'arguments en faveur de cette hypothèse. Cependant, en 1964 (b) EL BASYOUNI et ses collaborateurs démontraient que chez certains végétaux, les acides benzoïques pouvaient également se former

* Un certain nombre de revues générales ont déjà paru sur ce sujet (voir NEISH, 1960, 1964 ; PRIDHAM, 1965 ; BROWN 1966 ; YOSHIDA, 1969) et seuls sont rappelés ici les faits essentiels.

comme les acides cinnamiques, par hydroxylations et méthylations successives du premier terme de la série, l'acide benzoïque.

En ce qui concerne l'acide gallique des expériences de compétition entre plusieurs précurseurs radioactifs (CONN et SWAIN, 1961 ; ZAPROMETOV et BUKHLAEVA, 1968 ; DEWICK et HASLAM, 1968) montraient l'origine directe de ce composé à partir d'intermédiaires de la voie de l'acide shikimique. GAMBORG (1967) indiquait qu'il en était de même pour l'acide protocatéchique et TATEOKA (1968) mettait en évidence l'enzyme catalysant la formation de ce dernier composé à partir de l'acide déshydroshikimique. Ce biocatalyseur demeura d'ailleurs longtemps le seul caractérisé en ce qui concerne la biosynthèse des acides benzoïques.

L'impossibilité de mettre en évidence les acides phénoliques à l'état libre a initialement conduit à considérer les formes combinées comme seules métaboliquement actives (LEVY et ZUCKER, 1960 ; EL BASYOUNI et al., 1964a et EL BASYOUNI et NEISH, 1966) ; cette hypothèse apparaissait en contradiction avec l'identification d'enzymes agissant spécifiquement sur les acides cinnamiques libres. Des travaux ultérieurs devaient en fait démontrer que seules les réactions entre les différents acides phénols, s'effectuent au niveau des acides libres (FRITIG et al., 1970). Les transformations des unités simples en esters (STOCKIGT et ZENK, 1974), flavonoïdes (KREUZALER et HAHLBROCK, 1972 ; EBEL et GRISEBACH, 1973) ou lignines (STOCKIGT et al., 1973 ; GROSS et al., 1973) nécessitaient au contraire une activation préalable par le coenzyme A.

Après ces quelques rappels bibliographiques, il semble que les voies de biosynthèse des acides phénoliques soient pour l'essentiel connues. Cependant, les recherches qui viennent d'être évoquées ont été menées de façon fragmentaire, chez des végétaux différents et laissent apparaître encore de nombreuses imprécisions (au sujet du métabolisme des acides benzoïques en particulier). Mon projet a donc été de réaliser une approche plus cohérente de ce métabolisme.

Au cours de ce travail, effectué chez une même espèce Quercus pedunculata, trois niveaux ont été successivement abordés :

- la détermination du mode de formation des acides phénols à l'aide des traceurs radioactifs,
- la confirmation de certaines voies métaboliques suggérées par cette première étude, par la mise en évidence des enzymes catalysant les réactions,

- la recherche des mécanismes de régulation assurant le contrôle des voies de biosynthèse des acides benzoïques et cinamiques (formes isofonctionnelles des enzymes, localisation intracellulaire des biocatalyseurs).

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

I.- LE MATERIEL VEGETAL

II.- LES METHODES D'ETUDES METABOLIQUES PAR LA TECHNIQUE DES TRACEURS RADIOACTIFS

- 1.- L'incorporation des précurseurs radioactifs
- 2.- Extraction, purification et séparation des acides phenoliques

III.- METHODES D'ETUDE DES ENZYMES

- 1.- L'extraction et la purification
- 2.- Les réactions enzymatiques
- 3.- Dosage des protéines

IV.- LA DETECTION ET LE DOSAGE DE LA RADIOACTIVITE

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

I.- LE MATERIEL VEGETAL

Toutes les études métaboliques et enzymatiques ont été réalisées à partir de jeunes racines de Chêne obtenues sur tourbe humide, à l'obscurité totale et récoltées au stade 5 (voir tableau IV, page 7).

Le matériel végétal est utilisé immédiatement après la récolte après avoir été abondamment lavé à l'eau, puis à l'eau distillée et enfin séché entre deux feuilles de papier filtre.

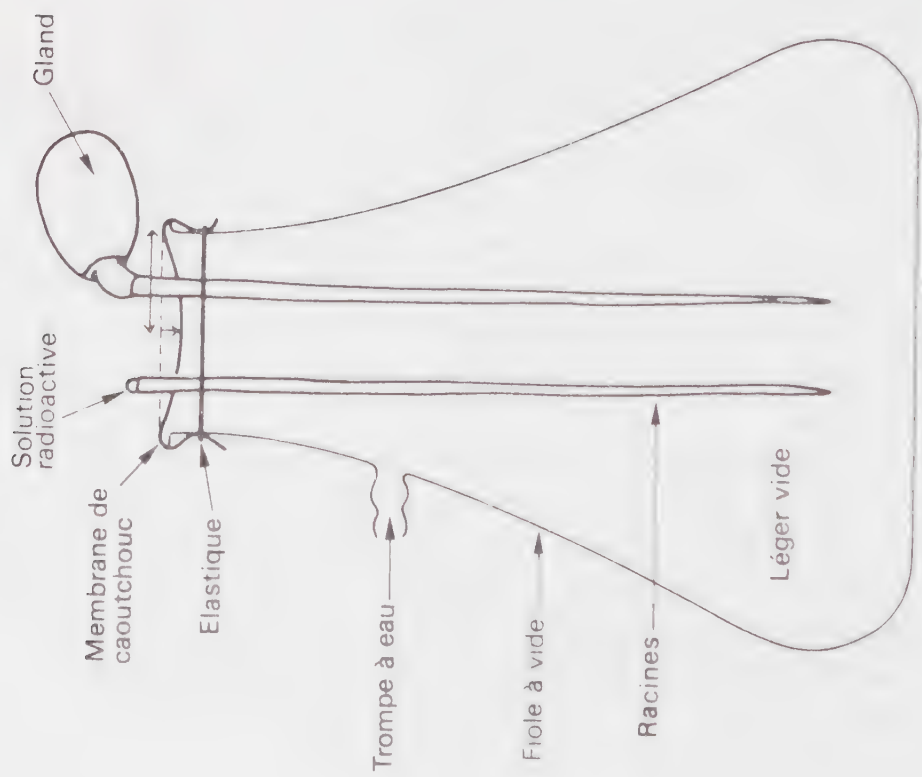
Dans le cas des études métaboliques ces opérations sont effectuées en lumière verte de façon à limiter l'action de la lumière sur le végétal.

II.- LES METHODES D'ETUDES METABOLIQUES PAR LA TECHNIQUE DES TRA- CEURS RADIOACTIFS

1.- L'incorporation des précurseurs radioactifs

Les jeunes racines, disposées dans une enceinte où l'on produit un léger vide (schéma III), sont sectionnées transversalement à l'aide d'une lame de rasoir à un demi centimètre au-dessous du collet. Sur la section plane ainsi réalisée on dépose une goutte de solution radioactive qui pénètre alors assez rapidement dans l'organe sous l'effet de la dépression. Après absorption totale, on ajoute une goutte supplémentaire et ainsi de suite : on peut ainsi facilement incorporer 20 μ l de liquide par racine en 20 minutes environ.

Après l'absorption du précurseur, on fait absorber 5 μ l d'eau distillée puis, pendant des temps de métabolisation variables, on dispose les organes dans des tubes à essai contenant de l'eau distillée. A la fin de cette période, les racines sont rincées puis fixées à l'azote liquide et lyophilisées. On détermine le poids du matériel sec et on conserve les organes en flacons au congélateur à -20° C, jusqu'au moment de l'analyse.



Dispositif utilisé pour l'incorporation des précurseurs radioactifs



Dispositif utilisé pour la métabolisation

2.- Extraction, purification et séparation des acides phénoliques

La méthode retenue est essentiellement celle décrite dans la première partie de ce travail. Elle permet d'obtenir quantitativement les acides phénoliques libres et leurs esters (sans pouvoir cependant distinguer ce qui est redevable de chacune de ces deux formes).

Au stade retenu, et pour les quantités de matériel végétal analysées (de l'ordre de 250 mg), la détection en lumière UV ne s'avère pas suffisamment sensible; aussi avant le dépôt sur la colonne de Polyclar, on ajoute à l'extrait végétal purifié un volume déterminé d'une solution d'acides phénoliques témoins (entraîneurs inertes permettant de localiser la sortie de chaque acide phénol). On recueille l'éluat sur collecteur de fractions et la radioactivité de chaque acide est appréciée après évaporation du solvant sous vide*.

Pour les acides cinnamique et benzoïque, non séparés sur Polyclar, on effectue une électrophorèse préparative de façon à obtenir les deux composés bien individualisés.

III.- METHODES D'ETUDE DES ENZYMES

1.- L'extraction et la purification

La mise au point des méthodes d'extraction des enzymes à partir de tissus de Quercus pedunculata a fait l'objet de travaux importants au laboratoire (BOUDET, 1965 ; GADAL, 1970 ; BOUDET, 1972) qui ont abouti à la définition d'un protocole standard tenant compte en particulier de la richesse en polyphénols du végétal.

Toutes les opérations d'extraction sont effectuées entre 0° et 4° C. Les racines, en général 6 à 7 g de matériel frais (15 à 20 organes), sont broyées au broyeur Ultra-Turrax (Janke et Kunkel KG) à deux reprises pendant une minute dans un milieu

* Au cours d'un certain nombre d'analyses, des contrôles de la pureté des acides phénols élués de la colonne ont été effectués : une fraction aliquote de la solution de chaque acide obtenu après séparation sur Polyclar est chromatographiée dans le solvant butanol - acide acétique - eau (6-1-2 v/v) ou soumise à l'électrophorèse. Dans tous les cas envisagés, la radioactivité détectée par autoradiographie s'est trouvée associée seulement à l'acide phénolique considéré.

de composition suivante :

- tampon phosphate mono-dipotassique M/10 de pH 7,5 (50 ml)
- Polyclar AT (2 %)*
- PEG (1 %)*
- thioglycolate de sodium (0,2 %)**

On centrifuge ensuite pendant 15 minutes à 1 500 g (MSE HS 18) afin d'éliminer les débris cellulaires puis à partir du surnageant on précipite les protéines solubles par le sulfate d'ammonium à 80 % de saturation (DIXON, 1953) tout en maintenant le pH de l'extrait entre 7 et 7,5 par addition d'ammoniaque concentrée. On laisse la précipitation se poursuivre pendant une demi-heure sous agitation lente et on centrifuge à 40 000 g pendant une heure. Le surnageant est écarté et la partie insoluble reprise par 2 ml de tampon phosphate mono-dipotassique M/10 de pH 7,5.

La source d'enzyme ainsi obtenue contient, outre les protéines solubles précipitables par le sulfate d'ammonium, les particules membranaires qui sédimentent à 40 000 g. Celle-ci a été utilisée directement ou après purification sur tamis moléculaire (Sephadex G 50) et parfois également sur DEAE-cellulose (Bio-Rad); dans tous les cas les protocoles utilisés seront décrits au moment de leur mise en oeuvre.

2.- Les réactions enzymatiques

J'ai utilisé le plus souvent les techniques d'étude radiochimique des enzymes qui tout en reculant les limites de sensibilité des méthodes traditionnelles (spectrophotométrie ou autres...) apportent l'avantage de leur spécificité (REED, 1968 ; PICHAT, 1970).

Le protocole général d'étude retenu est le suivant :

Les réactions enzymatiques sont effectuées dans des tubes à essais de 35 ml fermés hermétiquement par un bouchon de téflon. On laisse équilibrer le milieu réactionnel 15 minutes à 30° C, puis on ajoute l'extrait enzymatique ; la réaction se poursuit alors à cette température sous agitation constante. Après des temps variables, selon les cas, on acidifie par l'acide chlorhydrique

* Le PEG (polyéthylène glycol, PM = 6000) et le Polyclar ont pour but de fixer les composés phénoliques sous forme de complexes insolubles.

Le Polyclar est traité par HCl puis lavé et déshydraté préalablement comme il a été décrit dans la première partie.

** Le rôle du thioglycolate est de diminuer les phénomènes d'oxydation des composés phénoliques, à l'origine de quinones inhibitrices des enzymes (ANDERSON et ROWAN, 1967) et de protéger les groupements -SH des protéines.

puis on extrait les composés phénoliques par agitation du milieu réactionnel en présence d'éther éthylique. L'éther est évaporé sous vide partiel et le composé formé enzymatiquement purifié à l'aide d'une technique chromatographique appropriée.

3.- Dosage des protéines

Les teneurs en protéines, exprimées en μ g d'azote, ou en mg de protéines (obtenus en multipliant par le facteur 6,25 les quantités d'azote) ont toujours été déterminées colorimétriquement par la méthode de Nessler, selon le protocole de LANG (1958).

IV.- LA DETECTION ET LE DOSAGE DE LA RADIOACTIVITE

La radioactivité sur les chromatogrammes est détectée par autoradiographie (films KODAK, Kodirex, deux faces Estar, 30 x 40 cm), pendant des temps allant de 2 à 3 semaines.

Un détecteur à scintillation en milieu semi-liquide dispositif Roucayrol, Oberhausen, Schüssler (SAIP, modèle DMSL 1) associé à un intégrateur et un enregistreur a permis la détection rapide de la radioactivité sur les chromatogrammes (en présence du mélange scintillant de BRAY, 1960).

Enfin, toutes les mesures de radioactivité ont été effectuées à l'aide d'un compteur à scintillation PACKARD (modèle 2211), dans le mélange scintillant de BRAY (1960). La correction de quenching est obtenue par la méthode du rapport des canaux.

CHAPITRE II

LES VOIES DE BIOSYNTHESE DES ACIDES PHENOLIQUES CHEZ

Quercus pedunculata (Ehrh.)

I.- BIOSYNTHESE DES ACIDES DE LA SERIE CINNAMIQUE

II.- BIOSYNTHESE DES ACIDES DE LA SERIE BENZOÏQUE

- 1.- L'acide benzoïque
- 2.- L'acide p-hydroxybenzoïque
- 3.- Les acides salicylique et gentisique
- 4.- Les acides protocatéchique et gallique
- 5.- L'acide vanillique et l'acide syringique

III.- REMARQUE

IV.- CONCLUSION

CHAPITRE II

LES VOIES DE BIOSYNTHESE DES ACIDES PHENOLIQUES CHEZ

Quercus pedunculata (Ehrh.)

Des recherches sur le métabolisme des acides phénoliques chez Quercus pedunculata ont déjà été effectuées dans notre laboratoire. BOUDET (1972) a mis en évidence la voie de l'acide shikimique chez ce végétal ainsi que l'intervention de l'acide quinique dans la formation des acides phénols. En collaboration avec MARIGO et BOUDET (MARIGO et al., 1969) j'ai pu montrer, par ailleurs, que les acides protocatéchique et gallique étaient directement issus de précurseurs non aromatiques de la voie de l'acide shikimique.

Afin de déterminer les voies biosynthétiques qui mènent, à partir de l'acide cinnamique, aux différentes unités en C_6-C_3 et aux autres composés de la série en C_6-C_1 , j'ai fourni au végétal, au cours d'expériences parallèles mais comparables, les deux premiers termes de chacune des deux séries (acide cinnamique et acide benzoïque) ainsi que l'acide p-coumarique. Ce dernier composé est en effet issu chez les Graminées du métabolisme primaire, comme l'acide cinnamique, et peut représenter chez ces végétaux le premier terme de la série.

Les trois composés, marqués par le ^{14}C ont été incorporés à différents lots de jeunes racines de Chêne. L'ensemble des données expérimentales correspondant à ces expériences sont consignées dans le tableau XXI.

Afin d'établir les cinétiques de marquage des acides phénoliques issus de chacun des trois précurseurs, quatre essais ne différant que par la durée de la métabolisation, ont été effectués dans chaque cas.

Les résultats sont toujours exprimés en pourcentage de la radioactivité des produits solubles dans l'éthanol à 80° G.L., une expression en fonction de la radioactivité totale fournie ne conduisant pas à modifier sensiblement les interprétations.

TABLEAU XXI

Principales données expérimentales concernant l'incorporation des trois précurseurs radioactifs

Précurseurs fournis (1,5 μ Ci)	Durée de la métabolisation (en heures)	Masse du matériel sec (en g) correspondant à 5 organes
Cinnamique* (54,5 mCi/mM)	2	0,251
	4	0,172
	8	0,292
	16	0,257
p-Coumarique** (190 mCi/mM)	2	0,286
	4	0,292
	8	0,168
	16	0,261
Benzoïque*** (45 mCi/mM)	2	0,254
	4	0,215
	8	0,246
	16	0,227

*Cinnamique - spécifiquement marqué sur le carbone 3 de la chaîne latérale (origine C.E.A.).

**p-Coumarique - synthétisé enzymatiquement au laboratoire à partir de tyrosine ^{14}C , par action de la tyrosine ammonia-lyase du Maïs (voir annexe en fin de Thèse).

***Benzoïque - uniformément marqué sur le cycle (origine Radiochemical Centre, Amersham, Angleterre).

I.- BIOSYNTHESE DES ACIDES DE LA SERIE CINNAMIQUE

Des trois précurseurs fournis, seuls les acides cinnamique et p-coumarique s'incorporent dans les composés en $\text{C}_6\text{-C}_3$ (tableau XXII).

A partir de l'acide cinnamique, sont radioactifs les acides p-coumarique, férulique et caféique, tandis que l'acide p-coumarique ne donne naissance qu'aux acides caféique et férulique ; la formation du composé monohydroxylé représente donc une étape directe entre l'acide cinnamique et les acides caféique et férulique.

TABEAU XXII

Radioactivité des acides de la série en C₆-C₃ à partir des acides cinnamique, p-coumarique et benzoïque marqués par le ¹⁴C

Précurseur ¹⁴ C	Acide cinnamique				Acide p-coumarique				Acide benzoïque			
Durée de la métabolisation (en heures)	2	4	8	16	2	4	8	16	2	4	8	16
Radioactivité*												
CINNAMIQUE	nd	305	153	13	-	-	-	-	-	-	-	-
p-COUMARIQUE	50	290	330	80	2050	600	320	70	-	-	-	-
CAFEIQUE	29	nd	84	23	150	93	79	50	-	-	-	-
FERULIQUE	38	96	150	51	130	140	300	74	-	-	-	-

* Exprimée en % x 10⁻² de la radioactivité de la fraction soluble dans l'éthanol à 80° G.L.

nd = Non déterminé

- = Non marqué

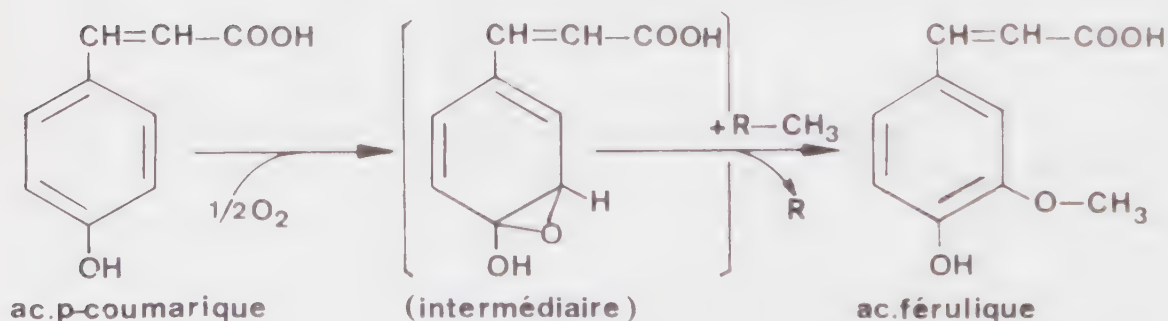
Sur la base de la structure chimique des composés en C_6-C_3 et des résultats fournis par une étude cinétique de marquage de ces acides à partir de la phénylalanine ^{14}C , Mac CALLA et NEISH (1959b) ont établi chez Salvia l'ordre de filiation suivant :



Il semble que chez le Chêne la situation soit plus complexe : en effet, si lorsque le précurseur est l'acide p-coumarique, on obtient bien une cinétique de marquage en accord avec les résultats de Mac CALLA et NEISH (1959 b), on note en revanche que l'acide férulique est toujours plus marqué que l'acide caféique lorsque le précurseur est l'acide cinnamique.

Ces résultats apparemment contradictoires laissent penser que les précurseurs fournis exogènement n'ont pas accès de la même façon aux sites de biosynthèse de l'acide férulique, ou bien que ce dernier composé ne se forme pas toujours selon le schéma généralement admis.

Il pourrait y avoir deux modes de formation possible de ce composé : l'un selon la voie classique, l'autre par méthylation directe de l'acide p-coumarique (possibilité déjà envisagée par ailleurs par NEISH, 1964 et STAFFORD, 1969). Dans ce dernier cas, la "séquence réactionnelle" serait la suivante (DALY et al., 1972 ; MANITTO, 1974*) :



* Dr. MANITTO P., Institut de Chimie Organique, Faculté des Sciences Université de Milan, Italie. Communication personnelle.

Des études complémentaires semblent donc indispensables avant de conclure définitivement sur les voies de biosynthèse des acides cinnamiques chez Quercus.

II.- BIOSYNTHESE DES ACIDES DE LA SERIE BENZOÏQUE

Les radioactivités détectées dans chacun des acides de la série benzoïque à partir des trois précurseurs radioactifs sont données dans le tableau XXIII. On remarquera que l'acide cinnamique représente le précurseur le plus général (voir également le tableau XXII), les acides p-coumarique et benzoïque étant plus spécifiquement incorporés dans certains acides. Ce résultat met bien en évidence chez le Chêne le rôle de précurseur initial des acides phénoliques joué par l'acide cinnamique.

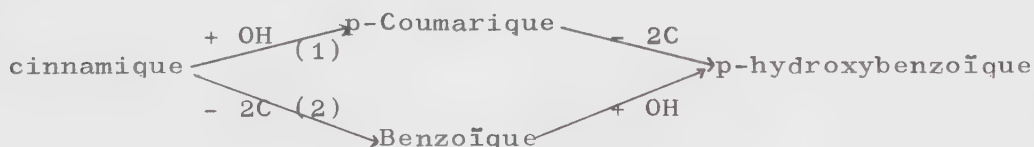
1.- L'acide benzoïque

L'acide benzoïque se synthétise uniquement à partir de l'acide cinnamique, sans doute par β -oxydation et perte de deux atomes de carbone (ZENK, 1966). Sa radioactivité très faible à tout moment et décroissante, indique que ce composé doit se former rapidement à partir du précurseur et qu'il est soumis à un "turn over" rapide.

2.- L'acide p-hydroxybenzoïque

Contrairement au cas de l'acide benzoïque, les trois composés fournis au végétal sont de bons précurseurs de l'acide p-hydroxybenzoïque. La formation de cet acide phénol, à partir de l'acide cinnamique semble donc chez le Chêne pouvoir emprunter deux voies :

- l'une faisant intervenir d'abord une hydroxylation de l'acide cinnamique en acide p-coumarique puis une β -oxydation de ce dernier (1)
- l'autre passant par l'hydroxylation de l'acide benzoïque issu de l'acide cinnamique (2).



ZENK et MULLER (1964) et ZENK (1966) pensent que cette seconde voie ne correspond pas à une série de réactions se déroulant réellement in vivo mais plutôt que les acides en C_6-C_1 , fournis exogènement, empruntent des voies métaboliques normalement réservées aux composés en C_6-C_3 .

TABLEAU XXIII

Formation des acides de la série en C₆-C₁ à partir des acides cinnamique, p-coumarique et benzoïque marqués par le ¹⁴C

Précurseur ¹⁴ C	Acide cinnamique			Acide p-coumarique			Acide benzoïque		
Durée de la métabolisation (en heures)	2	4	8	16	2	4	8	16	2
Radioactivité*									
BENZOIQUE	13	10	10	1	-	-	-	-	20
SALICYLIQUE	83	140	140	33	-	-	-	-	78
GENTISIQUE	27	10	10	3	-	-	-	-	11
p-HYDROXYBENZOIQUE	44	41	73	14	180	190	120	88	73
PROTOCATECHIQUE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GALLIQUE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VANILLIQUE	27	44	36	6	32	26	25	17	-
SYRINGIQUE	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* En % x 10⁻² de la radioactivité des produits solubles dans l'éthanol à 80° G.L.

- : Non marqué

EL BASYOUNI et al. (1964 b) affirment au contraire que les deux voies peuvent coexister chez les végétaux. Dans cette dernière optique, un problème intéressant à étudier serait celui du rôle respectif des deux "pools" d'acide p-hydroxybenzoïque au sein de la cellule. Il est apparu en effet, au cours de la première partie de ce travail que ce composé présentait des variations intimement liées au développement du végétal, par ailleurs WHISTANCE et al. (1966, 1967) puis POWLS et HEMMING (1966) ont développé une série d'arguments prouvant l'intervention de l'acide p-hydroxybenzoïque, synthétisé via l'acide p-coumarique, dans la formation de l'ubiquinone. Il est peu probable que des fonctions aussi diverses soient assurées par le même "pool" ; une séparation intracellulaire des molécules d'acide p-hydroxybenzoïque d'origine différente semble donc vraisemblable.

3.- Les acides salicylique et gentisique

Les acides cinnamique et benzoïque sont tous deux de bons précurseurs de l'acide salicylique. L'acide gentisique quant à lui dérive probablement de l'hydroxylation de l'acide salicylique comme cela a déjà été montré chez d'autres végétaux (IBRAHIM et TOWERS, 1959 ; BILLEK et SCHMOOK, 1967).

Chez le Chêne il semble donc que ces différents termes puissent se former suivant la filiation :

cinnamique —→ benzoïque —→ salicylique —→ gentisique

(voir IBRAHIM, 1964 ; EL BASYOUNI et al., 1964 b).

Cependant, GRISEBACH et VOLLMER (1963), puis VOLLMER et GRISEBACH (1966) ont également mis en évidence chez Gaultheria procumbens une voie de biosynthèse faisant intervenir la β -oxydation de l'acide o-coumarique (cinnamique —→ o-coumarique —→ salicylique). Ce composé n'a toutefois pas été mis en évidence chez Quercus et à aucun moment une valeur appréciable de la radioactivité n'a été détectée à son niveau (l'acide o-coumarique est élué de la colonne de Polyclar en même temps que l'acide protocatéchique voir figure 2 page 24). On ne peut cependant écarter totalement une telle voie de formation, l'acide o-coumarique se cyclisant rapidement en coumarine.

4.- Les acides protocatéchique et gallique

Chez le Chêne des études réalisées à partir d'acide shikimique et de phénylalanine ^{14}C (MARIGO et al., 1969) ont permis de montrer que dans les feuilles ces deux composés se forment à partir de l'acide 3-déshydroshikimique (comme c'est d'ailleurs

le cas chez le Haricot pour l'acide protocatéchique, TATEOKA 1968 ; le Géranium et le Thé pour l'acide gallique, CONN et SWAIN 1961 ; ZAPROMETOV et BUKHLAEVA, 1968). Les résultats obtenus ici confirment ces premières données puisque à aucun moment ces deux composés n'apparaissent radioactifs, quel que soit le précurseur fourni.

5.- L'acide vanillique et l'acide syringique

- Contrairement à ce qui a été décrit pour d'autres végétaux (EL BASYOUNI et al., 1964 b), il semble que chez le Chêne l'acide vanillique ne puisse se former qu'à partir des acides de la série cinnamique (sans doute par β -oxydation de l'acide férulique). L'absence de radioactivité au niveau de l'acide vanillique lorsque le précurseur est l'acide benzoïque élimine la possibilité d'une synthèse par hydroxylations et méthylations successives de ce dernier (benzoïque $\longrightarrow$ p-hydroxybenzoïque $\longrightarrow$ protocatéchique $\longrightarrow$ vanillique).

- L'acide syringique n'est jamais radioactif, quel que soit le précurseur envisagé. Il est possible que les temps de métabolisation retenus ne soient pas suffisamment longs pour que cet acide apparaisse marqué. Chez d'autres végétaux (voir EL BASYOUNI et al., 1964 b) l'acide syringique est issu de l'acide sinapique, ce dernier composé n'a cependant jamais pu être identifié chez le Chêne (ALIBERT et al., 1968). Enfin, bien que généralement admise, la formation directe à partir de l'acide vanillique n'a encore jamais pu être prouvée expérimentalement (EL BASYOUNI et al., 1964 b) IBRAHIM, 1964). On est donc en droit de s'interroger sur l'origine métabolique de ce composé, d'autant plus qu'au stade retenu, cet acide est présent en quantités importantes (voir tableau XIX b).

Selon TOWERS (1964) et BILLEK et SCHMOOK (1966) , il pourrait provenir d'une double méthylation de l'acide gallique (comme cela se produit chez les animaux) ; étant donné l'abondance et les variations quantitatives spectaculaires qui affectent le "pool" de ce composé au cours de la formation de la racine chez Quercus, une telle origine n'est pas à exclure.

III.- REMARQUE

Après deux heures de métabolisation seulement (tableaux XXII et XXIII), environ 99 % des acides cinnamique et benzoïque et 80 % de l'acide p-coumarique fournis ont disparu de la fraction soluble*

* Des recherches complémentaires ont montré que les acides cinnamique , p-coumarique et benzoïque, fournis au végétal ne se retrouvaient également que pour un très faible pourcentage sous forme d'éther-oxydes.

(un résultat comparable a été obtenu par COLONNA et BOUDET 1971, pour l'acide cinnamique chez le Café). D'autre part, on ne constate à aucun moment une accumulation de la radioactivité au niveau d'un quelconque acide phénol étudié. Ces deux considérations mettent en évidence le caractère d'intermédiaires rapidement renouvelés qui distingue les acides phénols des autres structures aromatiques des végétaux comme les lignines, les tannins et dans de nombreux cas les flavonoïdes, produits d'accumulation.

IV.- CONCLUSION

En fournissant différents précurseurs radioactifs, j'ai pu dégager chez le Chêne, les principaux modes de formation des acides phénoliques :

- Au niveau de la chaîne en C_6-C_3 , les résultats obtenus montrent que l'acide cinnamique est le précurseur initial de cette série. Les études cinétiques suggèrent par ailleurs l'existence possible d'une méthylation directe de l'acide p-coumarique.

- Au niveau de la chaîne en C_6-C_1 , mis à part les acides protocatéchique, gallique et syringique, tous les autres composés semblent dériver de la série cinnamique. Ils se forment soit par β -oxydation directe de leurs homologues en C_6-C_3 (cas du benzoïque, p-hydroxybenzoïque et vanillique) soit par hydroxylations successives à partir du premier terme de la série (salicylique, gentisique, p-hydroxybenzoïque). Il est à remarquer que, chez Quercus, l'acide p-hydroxybenzoïque présente une double origine métabolique.

Afin de confirmer la réalité in vivo des voies biosynthétiques révélées par l'utilisation des molécules marquées, j'ai tenté de mettre en évidence un certain nombre d'enzymes impliquées dans ces voies métaboliques ; ce travail sera décrit dans le chapitre suivant.

CHAPITRE III

SUR QUELQUES ENZYMES DU METABOLISME DES ACIDES PHENOLIQUES

CHEZ *Quercus pedunculata* (Ehrh.)

I.- LES ENZYMES DE LA VOIE C₆-C₃

- 1.- La phénylalanine ammonia-lyase (E.C. 4.3.1.5.)
- 2.- La cinnamate-4-hydroxylase
- 3.- La 4-hydroxycinnamate-3-hydroxylase (p-C-OH)
- 4.- La formation de l'acide férulique à partir de l'acide caféique sous l'action d'une O-méthyltransférase

II.- LA VOIE C₆-C₁

III.- CONCLUSIONS

CHAPITRE III

SUR QUELQUES ENZYMES DU METABOLISME DES ACIDES PHENOLIQUES

CHEZ Quercus pedunculata (Ehrh.)

Au cours de ce travail j'ai recherché les principales enzymes impliquées dans la formation des quatre acides cinnamiques présents chez le Chêne : la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), la cinnamate-4-hydroxylase (Cin-OH), la 4-hydroxycinnamate-3-hydroxylase (p-C-OH) et la caféoyl-O-méthyltransférase (C-O-MT). Par ailleurs, j'ai mis en évidence pour la première fois chez les végétaux supérieurs un système enzymatique assurant la transformation de l'acide cinnamique en acide benzoïque (ALIBERT et RANJEVA, 1971).

Etant donné les faibles niveaux d'activités enzymatiques relevés et la complexité des opérations de purification et de dosage des produits formés, je n'ai envisagé que les caractéristiques biochimiques essentielles des enzymes identifiés (pH optimum d'action, réponse à quelques inhibiteurs).

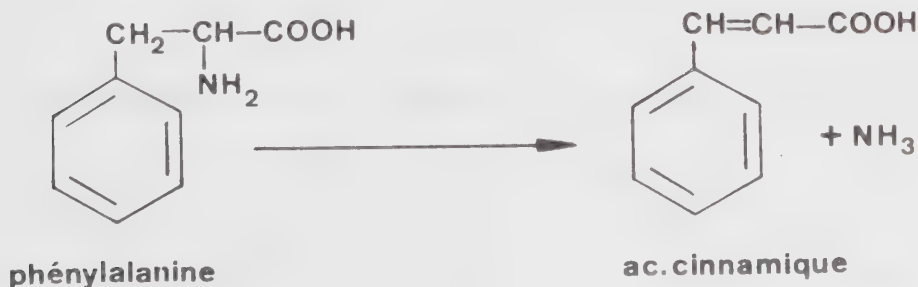
I.- LES ENZYMES DE LA VOIE C₆-C₃

1.- La phénylalanine ammonia-lyase (E.C. 4.3.1.5)

La PAL représente certainement à ce jour un des biocatalyseurs végétaux le plus étudié et l'intérêt porté à cette enzyme se concrétise par la parution successive d'un certain nombre d'articles généraux qui lui sont, exclusivement ou en partie, consacrés (voir CONN, 1964 ; YOSHIDA, 1969 ; MARCUS, 1971 ; ZUCKER, 1972 ; CAMM et TOWERS, 1973 a ; STAFFORD, 1974).

- Mise en évidence dans les racines de Quercus pedunculata

La PAL catalyse la réaction :



J'ai utilisé pour sa mise en évidence le protocole de KOUKOL et CONN (1961) et, compte tenu des résultats déjà obtenus par RANJEVA (1971) dans le cas des feuilles, j'ai retenu un pH d'action de 8,8. Le milieu réactionnel est donné dans le tableau XXIV.

TABLEAU XXIV

Composition des milieux réactionnels pour la mise en évidence de la phénylalanine ammonia-lyase

Composants du milieu	T	E
Solution enzymatique*	-	4 ml
Tampon borate-HCl 0,2 M, pH 8,8	4 ml	-
Phénylalanine ($60 \times 10^{-3}M$) dans le tampon borate	2 ml	2 ml
Phénylalanine U ^{14}C : 0,8 μCi	20 μl	20 μl
Durée de la réaction : 90 minutes		

* L'extrait obtenu après précipitation par le sulfate d'ammonium est dessalé par passage sur Sephadex G 50.

Après chromatographie dans les solvants butanol - acide acétique - eau (6-1-2 v/v) et acide acétique à 2 %, la radioactivité détectée au lecteur de chromatogramme SAIP s'avère correspondre à l'acide cinnamique. Aucune transformation de la phénylalanine n'est en revanche décelable à ce niveau dans le témoin.

Dans les conditions retenues, on obtient la formation de 124 nanomoles d'acide cinnamique par heure et par gramme de matériel végétal frais.

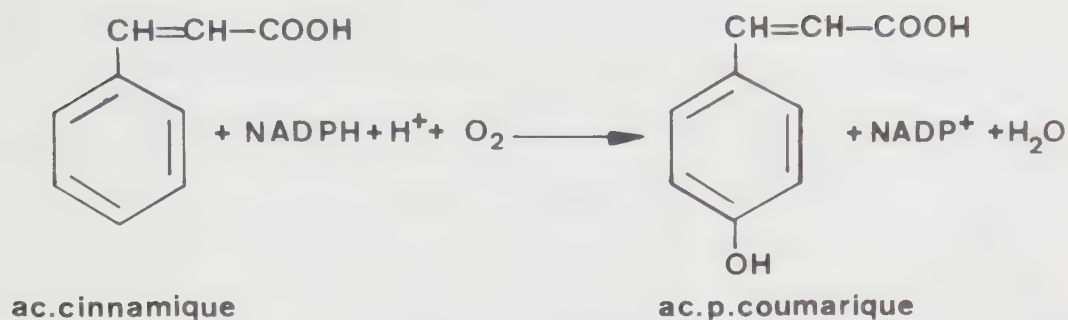
Les jeunes racines de Chêne possèdent donc, comme les feuilles, une activité phénylalanine ammonia-lyase.

2.- La cinnamate-4-hydroxylase

Cette activité enzymatique a été détectée pour la première fois chez l'Epinard par NAIR et VINING (1965) mais les recherches les plus importantes ont été effectuées chez le Pois par l'équipe de RUSSELL (RUSSELL et CONN, 1967 ; RUSSELL et al., 1968, RUSSELL 1971).

- Mise en évidence chez le Chêne

La réaction étudiée est la suivante :



En fonction des données fournies par les travaux de RUSSELL j'ai retenu, pour la recherche de cette enzyme un pH d'action de 8 (tableau XXV).

TABLEAU XXV

Milieu réactionnel utilisé pour la mise en évidence de la cinnamate-4-hydroxylase chez *Quercus pedunculata*

Composants du milieu	T	E
Extrait enzymatique*	-	0,1 ml
Acide cinnamique inerte 10 x 10 ⁻³ M	1 ml	1 ml
Acide cinnamique 3 ¹⁴ C 2 µCi	20 µl	20 µl
Tampon phosphate mono-dipotassique 0,1 M, pH 8	1,5 ml	1,4 ml
Acide ascorbique 120 x 10 ⁻³ M	0,250 ml	0,250 ml
NADPH, 4 x 10 ⁻³ M	0,250 ml	0,250 ml

* Extrait brut.

Après 90 minutes, le produit de la réaction est isolé du substrat par chromatographie préparative dans le solvant chloroforme - acide acétique - eau (2-1-1). La co-chromatographie avec l'acide p-coumarique (témoin commercial) dans les solvants benzène - acide acétique - eau (2-2-1 v/v : RUSSEL et CONN, 1967) et la série des solvants de REIO (1958) montre dans tous les cas que la radioactivité reste associée à l'acide p-coumarique. Aucune radioactivité n'est en revanche décelable dans le cas du témoin.

Les extraits enzymatiques de racines de Chêne sont donc capables de transformer l'acide cinnamique en acide p-coumarique. La vitesse de la réaction est cependant faible, on obtient dans les conditions expérimentales retenues 92 nanomoles d'acide p-coumarique par heure et par gramme de matériel végétal frais.

- Essais de purification de la Cin-OH : stabilité

L'extrait enzymatique perd son activité après purification sur colonne de Sephadex G 50. D'autre part, aucune activité n'est détectable dans un extrait brut conservé pendant 12 heures à 0° C.

Ces deux caractères se retrouvent également pour l'enzyme isolée de l'Epinard (NAIR et VINING, 1965) et du Pois (RUSSELL et CONN, 1967). En raison de l'impossibilité de purifier le biocatalyseur les propriétés biochimiques de la Cin-OH du Chêne ont été étudiées sur l'extrait brut.

- pH optimum d'action

La figure 7, indique que le pH optimum d'action de la cinnamate-4-hydroxylase du Chêne se situe aux alentours de 8. Cette valeur apparaît très différente de celle de l'enzyme mise en évidence chez l'Epinard (4,6) ; elle est en revanche voisine de celle obtenue pour le biocatalyseur identifié chez le Pois et le Sorgho (7,5) (STAFFORD, 1969 ; RUSSEL, 1971).

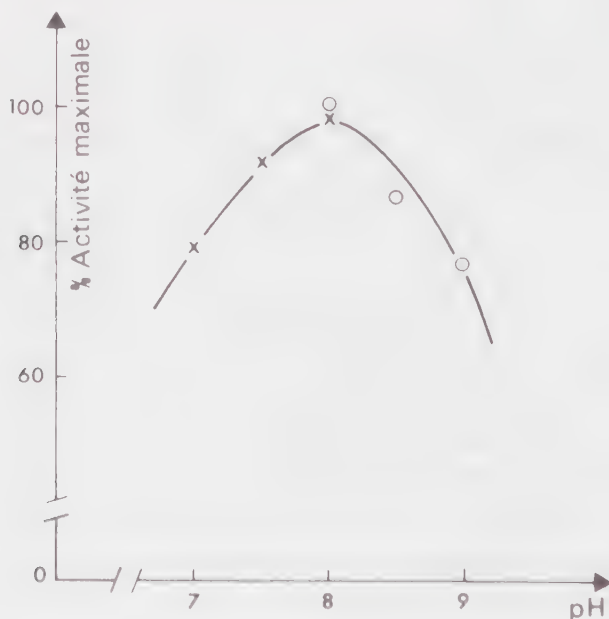


Figure 7 - pH optimum de la cinnamate-4-hydroxylase

x—x : tampon phosphate mono-dipotassique
o—o : tampon Tris-HCl

Un témoin est réalisé pour chaque valeur du pH.

L'activité de l'enzyme est nulle en deça de pH 5,5 et au-delà de pH 10,5.

- Rôle des cofacteurs

La réaction effectuée en absence d'acide ascorbique et de NADPH permet la formation d'une faible quantité d'acide p-coumarique , l'adjonction de ces deux cofacteurs provoquant une augmentation de l'activité de l'ordre de 60 %. Chez le Pois, au contraire, la Cin-OH présente un besoin absolu en réducteurs ; il est possible qu'un certain nombre de cofacteurs réduits soient précipités en même temps que la Cin-OH dans l'extrait brut, ce qui expliquerait l'activité relevée in vitro, en l'absence des cofacteurs chez le Chêne.

TABLEAU XXVI

Action de divers agents chélateurs des métaux sur la cinnamate-4-hydroxylase

Inhibiteur*	EDTA**	$\alpha\alpha'$ -dipyridyle	DIECA***
Activité en % de l'essai sans inhibiteur	22	64	96

* 10^{-3} M

** acide éthylènediaminetétraacétique

*** diéthylldithiocarbamate de sodium

l'EDTA et l' $\alpha\alpha'$ -dipyridyle provoquent une diminution importante de l'activité enzymatique (tableau XXVI), le diéthylldithiocarbamate en revanche est sans action sur l'enzyme : le biocatalyseur semble donc requérir la présence d'un groupement métallique essentiel (probablement le fer). Ce dernier résultat et la nécessité d'ajouter au milieu enzymatique des cofacteurs réduits pour un fonctionnement optimum de l'enzyme, rapprochent la Cin-OH des mono-oxygénases à fonction mixtes (MASON, 1957). Récemment d'ailleurs, BENVENISTE et DURST (1974) ont montré chez le Topinambour l'intervention du cytochrome P 450 dans l'hydroxylation de l'acide cinnamique, ce qui apparenterait la cinnamate-4-hydroxylase aux oxygénases à fonctions mixtes des animaux.

- La cinnamate-4-hydroxylase du Chêne est une enzyme particulière

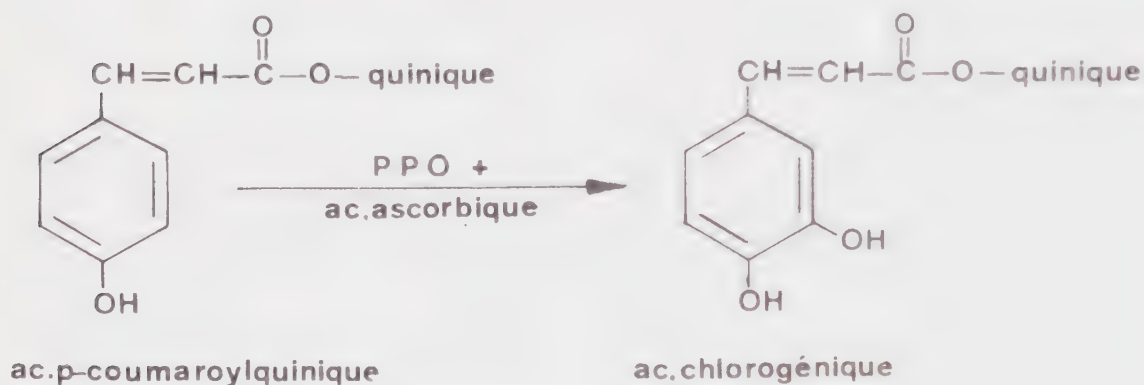
Si après précipitation des débris cellulaires à 1 500 x g, on centrifuge l'extrait enzymatique obtenu pendant une heure à 40 000xg seul le culot possède une activité hydroxylante vis-à-vis de l'acide cinnamique. Ce résultat est en accord avec les données obtenues chez le Pois (RUSSELL, 1971), le Sorgho (STAFFORD, 1969),

le Sarrasin (AMRHEIN et ZENK, 1969), le Persil (HAHLBROCK et al., 1971) ainsi que chez un champignon, Polyporus hispidus (VANCE et al., 1973) où la cinnamate-4-hydroxylase a été localisée dans les microsomes. Seuls, CAMM et TOWERS (1973) ont pu détecter cette activité enzymatique dans une fraction soluble extraite de tubercule de Pomme de terre.

L'association de la Cin-OH aux structures membranaires paraît donc très générale chez les végétaux.

3.- La 4-hydroxycinnamate-3-hydroxylase (p-C-OH)

En 1960, LEVY et ZUCKER montraient qu'un extrait acellulaire de tubercule de Pomme de terre était capable d'introduire un second hydroxyle en position 3 sur la partie phénolique de la molécule d'acide p-coumaroyl-quinique :



Cette réaction s'effectue à pH 8,3 en présence d'acide ascorbique. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques conduisait ces auteurs à attribuer cette activité aux fonctions hydroxylantes des polyphénol-oxydases (PPO*).

* Selon MASON (1957) les polyphénol-oxydases (ou complexe des phénolases) font partie des oxydases à fonctions mixtes. Elles sont caractérisées par la présence au sein de la même molécule protéique de deux activités enzymatiques : la phénol O-hydroxylase (ou activité crésolase) et la O-diphénol déhydrogénase (ou activité catécholase). L'activité crésolase requiert pour s'exprimer la présence d'un donneur d'électron (qui peut être dans certains cas le diphénol, produit par la réaction d'hydroxylation). La protéine enzymatique nécessite la présence de cuivre comme groupement prosthétique. Les PPO sont peu spécifiques.

Par la suite, PATIL et ZUCKER (1965), puis SATÔ (1966) et VAUGHAN et BUTT (1967, 1969), indiquaient également que l'acide p-coumarique lui-même pouvait être hydroxylé en acide caféique sous l'action de ces enzymes. Dans tous les cas, l'hydroxylation s'accompagnait après épuisement des cofacteurs réduits (acide ascorbique, NADPH contenus dans le milieu réactionnel) d'une oxydation de l'acide caféique formé en quinones.

- Mise en évidence d'une 4-hydroxycinnamate-3-hydroxylase chez le Chêne

J'ai retenu pour cette réaction les conditions expérimentales utilisées par VAUGHAN et BUTT (1969) (tableau XXVII).

TABLEAU XXVII

Composition du milieu réactionnel pour la mise en évidence de la 4-hydroxycinnamate-3-hydroxylase chez le Chêne

Composants du milieu	T	E
Extrait enzymatique*	-	0,1 ml
Extrait enzymatique porté 1 h à 100° C	0,1 ml	-
Acide p-coumarique 10×10^{-3} M	1 ml	1 ml
Tampon acide citrique - phosphate disodique 0,1 M, pH 5,3	1,4 ml	1,4 ml
Acide ascorbique 120×10^{-3} M	0,250 ml	0,250 ml
NADPH 4×10^{-3} M	0,250 ml	0,250 ml
Durée de la réaction : 30 minutes		

* Extrait brut obtenu après précipitation au sulfate d'ammonium.

On chromatographie pendant 12 heures, suivant la technique descendante sur papier Whatman N° 1, dans le solvant chloroforme-acide acétique - eau (2-1-1 v/v) qui permet une bonne séparation des acides p-coumarique (substrat) et caféique (produit de la réaction).

On note dans l'essai seulement la formation d'un composé possédant la position chromatographique, la fluorescence en lumière UV et les caractéristiques de révélation (voir tableau V, p. 14) de l'acide caféique. Enfin, le spectre UV du composé formé enzymatiquement correspond exactement à celui de l'acide caféique (figure 8).

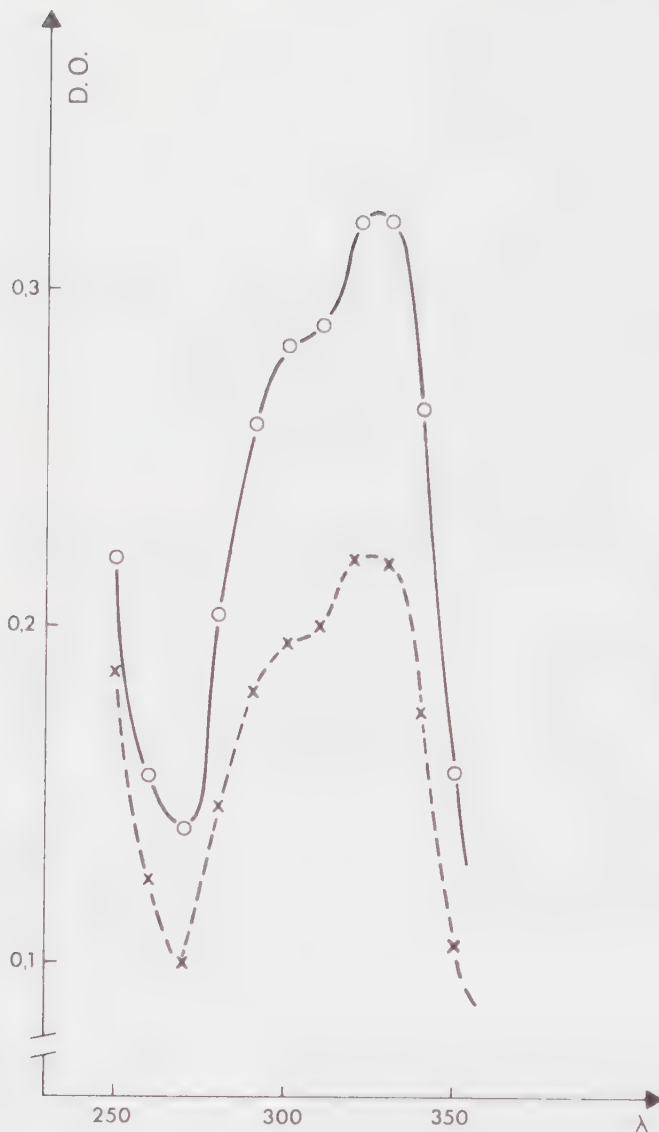


Figure 8 - Spectres UV dans l'éthanol à 95° G.L du composé formé enzymatiquement et d'une solution témoin d'acide caféique.

- Purification et stabilité

Le passage de l'extrait enzymatique brut sur colonne de Sephadex G 50 n'entraîne pas une perte importante de l'activité enzymatique. Par ailleurs, l'extrait brut présente une relative stabilité (l'enzyme conserve 76 % de son activité après 18 heures à 4° C).

Ces deux propriétés distinguent nettement la p-C-OH de la Cin-OH étudiée précédemment.

- Rôle des cofacteurs ; nature de l'enzyme effectuant l'hydroxylation de l'acide p-coumarique chez le Chêne

Après purification sur Sephadex G 50 et en absence de cofacteur, on n'observe pas la formation d'acide caféique. Seule l'adjonction de faibles quantités d'acide ascorbique au milieu réactionnel provoque l'apparition dans l'essai de l'acide caféique mais ce dernier disparaît rapidement si la réaction se prolonge dans le temps : il est probable qu'après oxydation totale de l'acide ascorbique, le diphénol soit transformé en quinone (SATÔ, 1969 ; EMBS et MARKAKIS, 1966).

TABLEAU XXVIII

Action de divers agents chélateurs des métaux sur l'activité de la 4-hydroxycinnamate-3-hydroxylase

Inhibiteur $10^{-3}M$	EDTA	α, α' dipyridyle	DIECA
Activité en % d'un essai réalisé sans inhibiteur	46	66	14

Dans les conditions retenues, la mesure spectrophotométrique à 320 nm (BECKMAN DB) de la quantité d'acide caféique indique la formation de 127 nanomoles par heure et par gramme de matériel végétal frais.

Enfin, le tableau XXVIII montre que l'enzyme est sensible aux agents chélateurs de métaux et particulièrement au DIECA ce qui laisse supposer la participation du cuivre à la réaction.

Ces deux résultats apparentent l'enzyme du Chêne aux différentes phénolases mises en évidence chez la Pomme de terre (LEVY et ZUCKER, 1960), le Saxifrage (SATÔ, 1966) ou encore la Betterave (VAUGHAN et BUTT, 1969) qui réalisent également l'hydroxylation de l'acide p-coumarique.

- pH optimum d'action

La courbe montrant les variations de l'activité enzymatique en fonction de la concentration en ions H^+ est donnée dans la figure 9.

On remarque la présence de deux optima : le premier aux environs de pH 4 (très semblable au pH optimum d'activité de la PPO du Chêne déterminée avec le crésol comme substrat- BARTHE, 1972), l'autre vers pH 8.

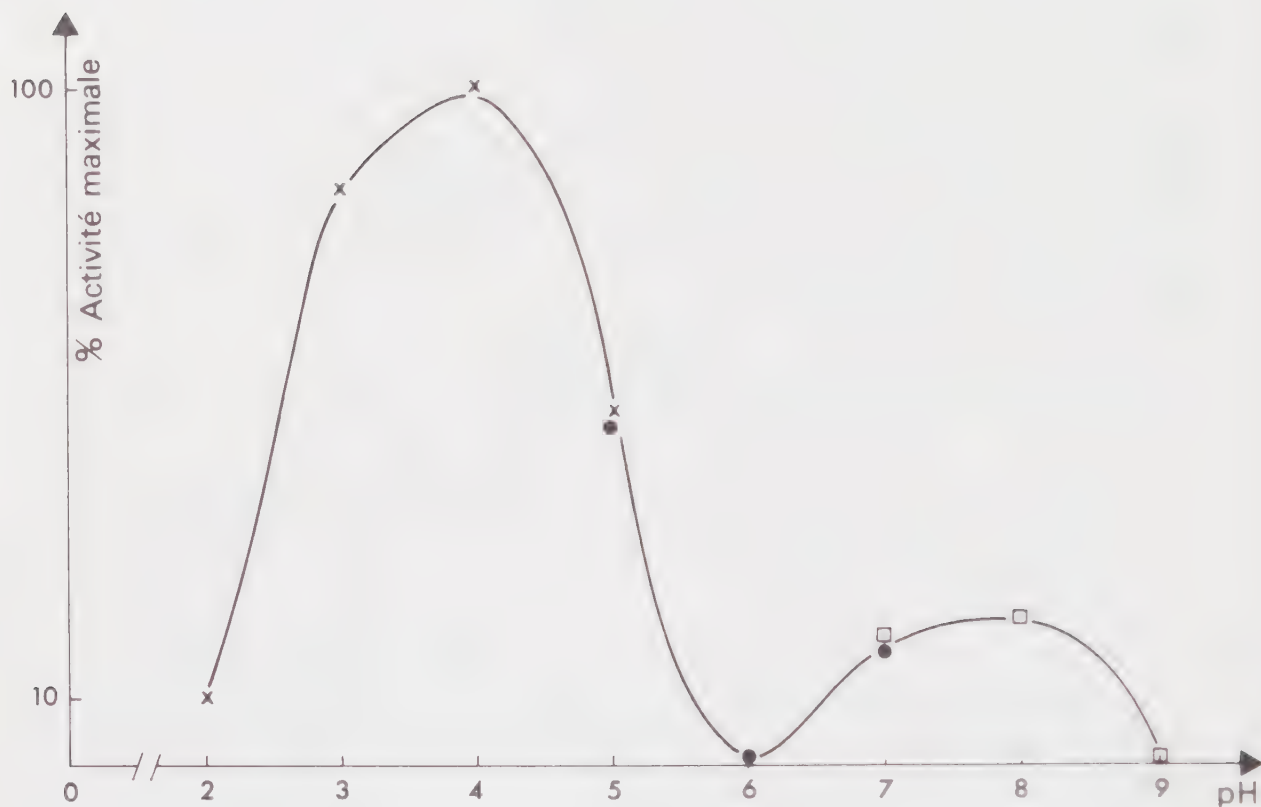


Figure 9 - pH optimum de la 4-hydroxycinnamate-3-hydroxylase

x — x : tampon acide citrique - phosphate disodique

● — ● : tampon phosphate mono-bipotassique

□ — □ : tampon Tris-HCl

Le dosage est effectué selon la technique radiochimique. Dans ce but on ajoute aux composants mentionnés dans le tableau XXVII 1 μ Ci d'acide p-coumarique ^{14}C (20 μ l).

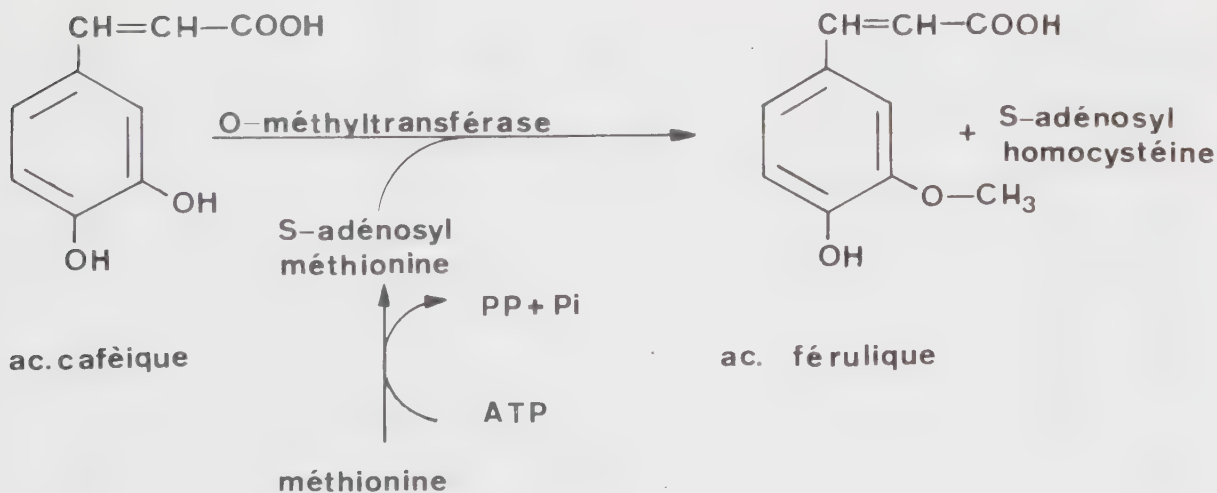
La présence de deux optima a déjà été signalée à plusieurs reprises au sujet de la PPO pour l'oxydation du catéchol (HAREL et al., 1964 , 1965 ; PATIL et ZUCKER, 1965 ; ROBB et al., 1966) mais à ma connaissance une telle observation est effectuée pour la première fois au niveau de l'hydroxylation de l'acide p-coumarique. Ce dernier résultat pourrait expliquer les premières données

de LEVY et ZUCKER (1960) indiquant que la PPO de la Pomme de terre agissait sur l'acide p-coumaroyl-quinique à pH 8,3.

En conclusion, il semble que chez Quercus l'hydroxylation de l'acide p-coumarique en acide caféique soit sous la dépendance des propriétés hydroxylantes des PPO comme cela avait été supposé initialement par Mac CALLA et NEISH (1959 b) puis LEVY et ZUCKER (1960), STAFFORD (1969) et STAFFORD et BLISS (1973) ont postulé l'existence chez les végétaux d'une seconde protéine catalytique dépourvue d'activité catécholase (donc différente des PPO) catalysant spécifiquement l'hydroxylation de l'acide p-coumarique. Il semble chez le Chêne qu'aucune autre enzyme que la PPO ne participe à la réaction, à moins que la mise en évidence de ce second biocatalyseur ne soit rendue très difficile en raison d'interférences avec les phénolases ou une très grande instabilité de la molécule enzymatique.

4.- La formation de l'acide férulique à partir de l'acide caféique sous l'action d'une O-méthyltransférase

La méthylation de l'acide caféique en acide férulique sous l'action d'extraits enzymatiques végétaux a été montrée pour la première fois par FINKLE et NELSON en 1963 puis confirmée par FINKLE et MASHRI(1964) et HESS (1964). La réaction envisagée est la suivante :



La formation de l'acide férulique à partir de l'acide caféique et de la méthionine nécessite préalablement l'activation

Photo 2

Séparation des acides de la série cinnamique sur colonne de Polyclar

Ac.
CINNAMIQUE

Ac.
FERULIQUE
Ac. p-COUMARIQUE



de la méthionine en S-adenosyl-méthionine qui fournira le groupement méthyle (tableau XXIX).

TABLEAU XXIX

Protocole utilisé pour la mise en évidence de la méthylation de l'acide caféique

Composants du milieu	T	E
Extrait enzymatique*	-	1 ml
Acide caféique 10^{-3} M dans le tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8	1 ml	1 ml
Méthionine 10^{-3} M		
Méthionine** (1 μ Ci)	0,2 ml	0,2 ml
MgCl ₂ 25×10^{-3} M	0,2 ml	0,2 ml
KCl 50×10^{-3} M	0,2 ml	0,2 ml
ATP 50×10^{-3} M	0,2 ml	0,2 ml
Glutathion (réduit) 50×10^{-3} M	0,2 ml	0,2 ml
Eau distillée	1 ml	-
Durée de la réaction : 60 minutes		

* Extrait obtenu après précipitation par le sulfate d'ammonium

** Méthionine - $^{14}\text{CH}_3$, C.E.A. 34,6 mCi/mM

L'acide férulique présentant des traînées en chromatographie sur papier, j'ai préféré, pour estimer la quantité de composé formé enzymatiquement, utiliser le protocole suivant :

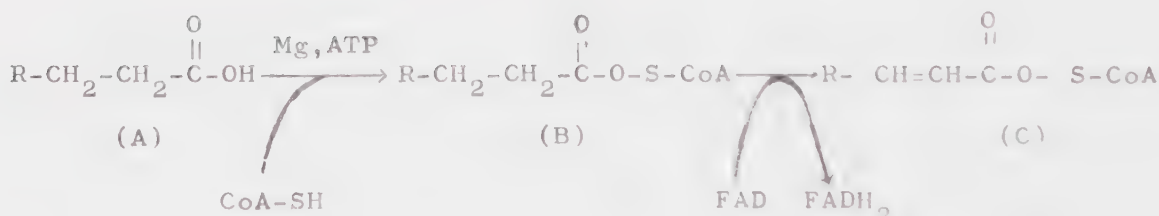
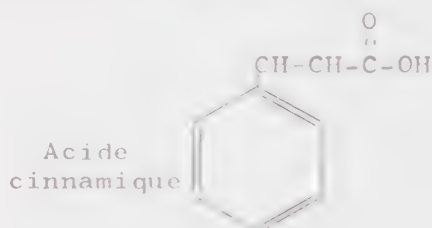
- L'acide férulique éventuellement formé est repris par 0,5 ml d'éthanol à 95° G.L. contenant 25 μ g d'acide férulique non radioactif comme entraîneur. Cette solution est déposée sur une colonne de Polyclar (voir première partie) de 1 x 30 cm, thermostatée à 40° C et équilibrée dans le solvant éthanol - acide acétique (99-1 v/v). On élue par le même solvant et les fractions correspondant à l'acide férulique sont réunies (voir photo 2). On évapore le solvant et on identifie le produit formé par chromatographie dans le toluène - acide acétique - eau (4-1-5 v/v) et l'acide acétique à 2 % ou on mesure la radioactivité de l'acide férulique en milieu scintillant liquide (PACKARD 2211).

Dans tous les cas la radioactivité reste associée à l'acide férulique au cours des différentes étapes de purification : l'extrait enzymatique obtenu à partir de racines de Chêne est donc capable, d'une part d'activer la méthionine en S-adenosyl-méthionine et, d'autre part, de transférer le groupe $-CH_3$ de ce composé sur l'acide caféique.

Dans les conditions expérimentales retenues, on obtient la formation de 10 nanomoles d'acide férulique par heure et par gramme de matériel végétal frais.

II.- LA VOIE C_6-C_1

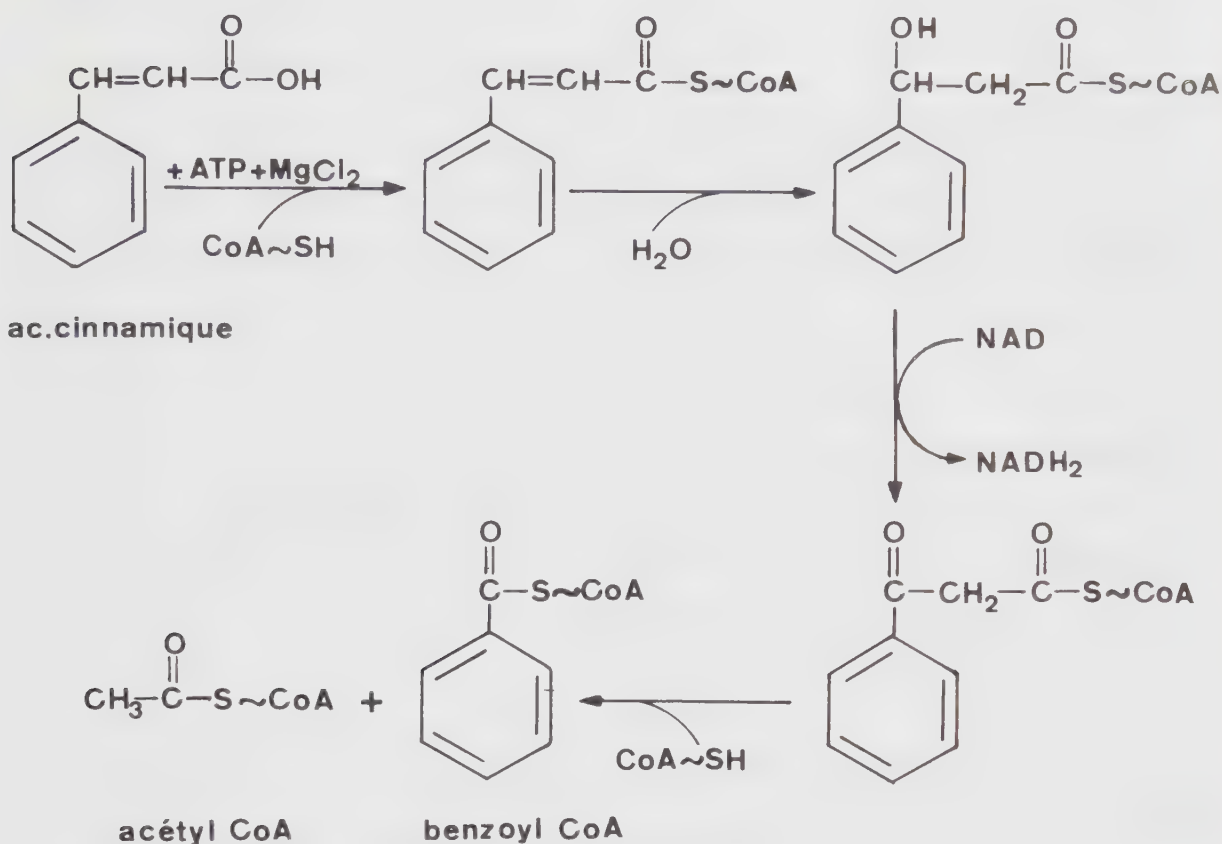
Dès 1952 GEISSMAN et HINREINER émettaient l'hypothèse d'une dégradation des acides cinnamiques en acides benzoïques. La similitude entre la chaîne latérale des acides cinnamiques et l'intermédiaire obtenu après la deuxième réaction du cycle d'oxydation des acides gras selon LYNEN (1955) (voir ci-dessous formule C) poussait GRISEBACH et VOLLMER (1963) à supposer l'existence d'un mécanisme de β -oxydation analogue pour les acides en C_6-C_3 .



R = Chaîne linéaire des acides gras.

Les travaux successifs de GRISEBACH et VOLLMER (1963), VOLLMER et al. (1965) et ZENK (1966) semblaient confirmer cette hypothèse bien qu'aucune enzyme effectuant les réactions de cette séquence dégradative n'ait jamais été mise en évidence. Enfin, en 1966, GROSS et ZENK s'inspirant des travaux initiaux de SCHACHTER et TAGGART (1953) montraient pour la première fois que les acides cinnamiques pouvaient être activés sous forme de cinnamoyl-CoA, première réaction supposée de la séquence de β -oxydation.

Compte tenu de ces résultats, j'ai recherché si un extrait acellulaire de racines de Chêne était capable, en présence de tous les éléments permettant l'oxydation des acides gras, de transformer l'acide cinnamique en acide benzoïque (réaction qui paraît s'effectuer in vivo, voir chapitre précédent) (figure 10).



ou globalement

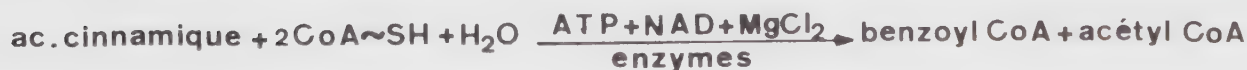


Figure 10 - Séquence réactionnelle théorique conduisant à la formation de l'acide benzoïque à partir de l'acide cinnamique (inspirée des données obtenues pour la β -oxydation des acides gras).

Le milieu réactionnel utilisé est donné dans le tableau XXX.

TABLEAU XXX

Milieu réactionnel utilisé pour la mise en évidence de la transformation de l'acide cinnamique en acide benzoïque

Composants du milieu	T ₁	T ₂	E
Extrait enzymatique*	-	-	0,5 ml
Extrait enzymatique porté 1 h à 100° C	0,5 ml	-	-
Acide cinnamique 10 ⁻³ M dans tampon	1 ml	1 ml	1 ml
Acide cinnamique 3 ¹⁴ C 0,1 µCi	20 µl	20 µl	20 µl
Tampon phosphate monodipotassique 0,1 M, pH 7,5	1 ml	1,5 ml	1 ml
Coenzyme A** 0,2 x 10 ⁻³ M)	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
NADP 2 x 10 ⁻³ M (			
ATP 20 x 10 ⁻³ M (			
MgCl ₂ 14 x 10 ⁻³ M)			
Durée de la réaction : 60 minutes			

* Extrait total obtenu après précipitation par le sulfate d'ammonium

** NBC, sel lithium (solutions dans l'eau).

On extrait tout d'abord par l'éther éthylique (a) puis sur la phase aqueuse on réalise une hydrolyse alcaline (WEBSTER et al., 1974) pour libérer l'acide benzoïque éventuellement présent sous forme d'ester du coenzyme A. On extrait à nouveau la fraction hydrolysée par l'éther éthylique (b).

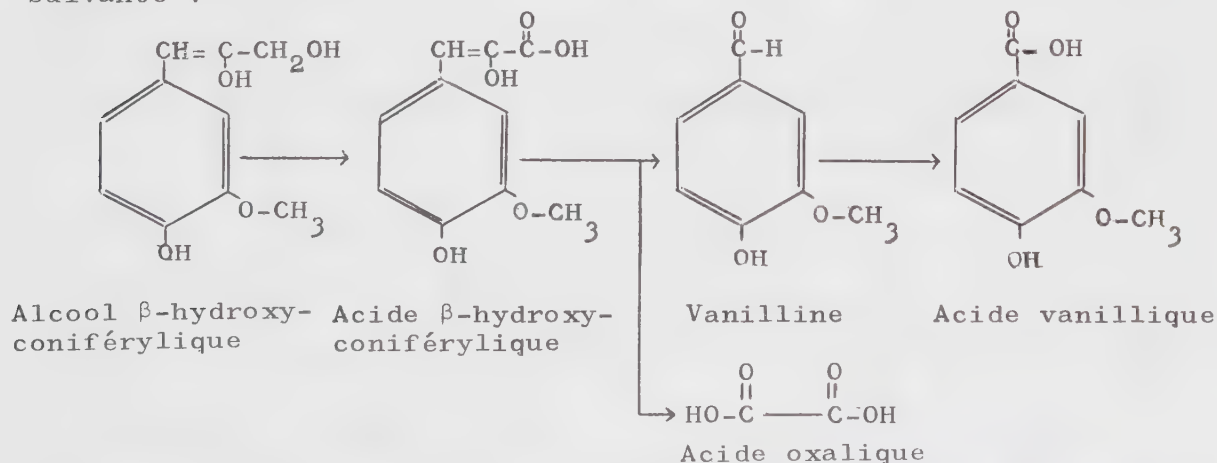
Après évaporation de l'éther on ajoute dans chaque cas 500 µl d'une solution d'acide benzoïque (50 µg) dans l'éthanol à 95° G.L. et on réalise une électrophorèse préparative. La bande correspondant à l'acide benzoïque, repérée en lumière UV (254 nm) est découpée et le composé élué par l'éthanol. On chromatographie enfin dans divers systèmes de solvants (REIO, 1958).

L'hydrolyse de la phase aqueuse (b) ne libère aucun produit marqué, il ne se forme donc pas du benzoyl-CoA comme le laissait supposer la séquence réactionnelle représentée dans la figure 10. En revanche, la phase étherée (a) obtenue avant hydrolyse, contient dans le cas de l'essai, un composé radioactif qui possède toutes les caractéristiques chromatographiques de l'acide benzoïque.

Deux expériences différentes ont permis d'obtenir successivement 428 puis 303 nanomoles d'acide benzoïque par heure et par gramme de matériel végétal frais. A ma connaissance, ce résultat a constitué (ALIBERT et RANJEVA, 1971) la première mise en évidence in vitro de la formation enzymatique de l'acide benzoïque à partir de l'acide cinnamique chez les végétaux supérieurs ; le système enzymatique catalysant cette fraction sera appelé "benzoate synthase" (= Benz-S).

- Mécanisme de la réaction

VOLLMER et al. (1965) et ZENK (1966) sur la base d'expériences in vivo ont apporté une série d'arguments en faveur d'un mécanisme de β -oxydation identique à celui mis en jeu pour les acides gras. Dans une telle situation, la réaction effectuée in vitro nécessiterait dans le milieu réactionnel la présence de Coenzyme A, d'ATP, de NAD et d'ions Mg^{++} , et conduirait à la formation de benzoyl-CoA (figure 10). Lors des expériences réalisées à partir des extraits enzymatiques de racines de Chêne, j'ai pu montrer que d'une part, la réaction pouvait s'effectuer sans adjonction de cofacteur, (le rendement étant alors de l'ordre de 62 % d'un essai complet) et, d'autre part, que le produit de la réaction était l'acide benzoïque et non le benzoyl-CoA (voir figure 10)*. Ces deux constatations ne plaident donc pas en faveur de l'hypothèse de GRISEBACH et VOLLMER (1963) ; on peut par ailleurs rappeler que ISHIKAWA et al. (1963) ont décrit une dégradation de l'alcool hydroxy-coniférylique (de structure chimique proche de l'acide férulique) en acide vanillique par des filtrats de culture mycéliens (Fomes fomentarius et Collybia velutipes) selon la réaction suivante :



* Chez les animaux (foie de rat) RANGANATHAN et RAMASARMA (1971) ont montré que la β -oxydation de l'acide p-coumarique in vitro ne requiert pas la présence de cofacteurs, le produit de la réaction étant également l'acide p-hydroxybenzoïque libre.

Etant donné les résultats obtenus chez le Chêne on ne peut écarter l'hypothèse d'une réaction de ce type. L'identification dans le milieu réactionnel du second produit de la réaction : l'acétyl-CoA ou l'acide oxalique pourrait seule permettre de connaître le mécanisme exact de cette réaction.

III.- CONCLUSIONS

Les résultats obtenus au cours de cette étude enzymatique confirment l'existence chez Quercus pedunculata d'un certain nombre de réactions métaboliques suggérées par les expériences radiochimiques. En fonction des données obtenues précédemment (MARIGO et al., 1969 ; MARIGO, 1970), les connaissances actuelles sur le mode de formation des acides phénoliques chez ce végétal peuvent se résumer comme il est indiqué dans le tableau XXXI. Ces résultats représentent à ma connaissance la tentative la plus complète d'élucidation des voies de biosynthèse des acides phénoliques, réalisée sur un même végétal.

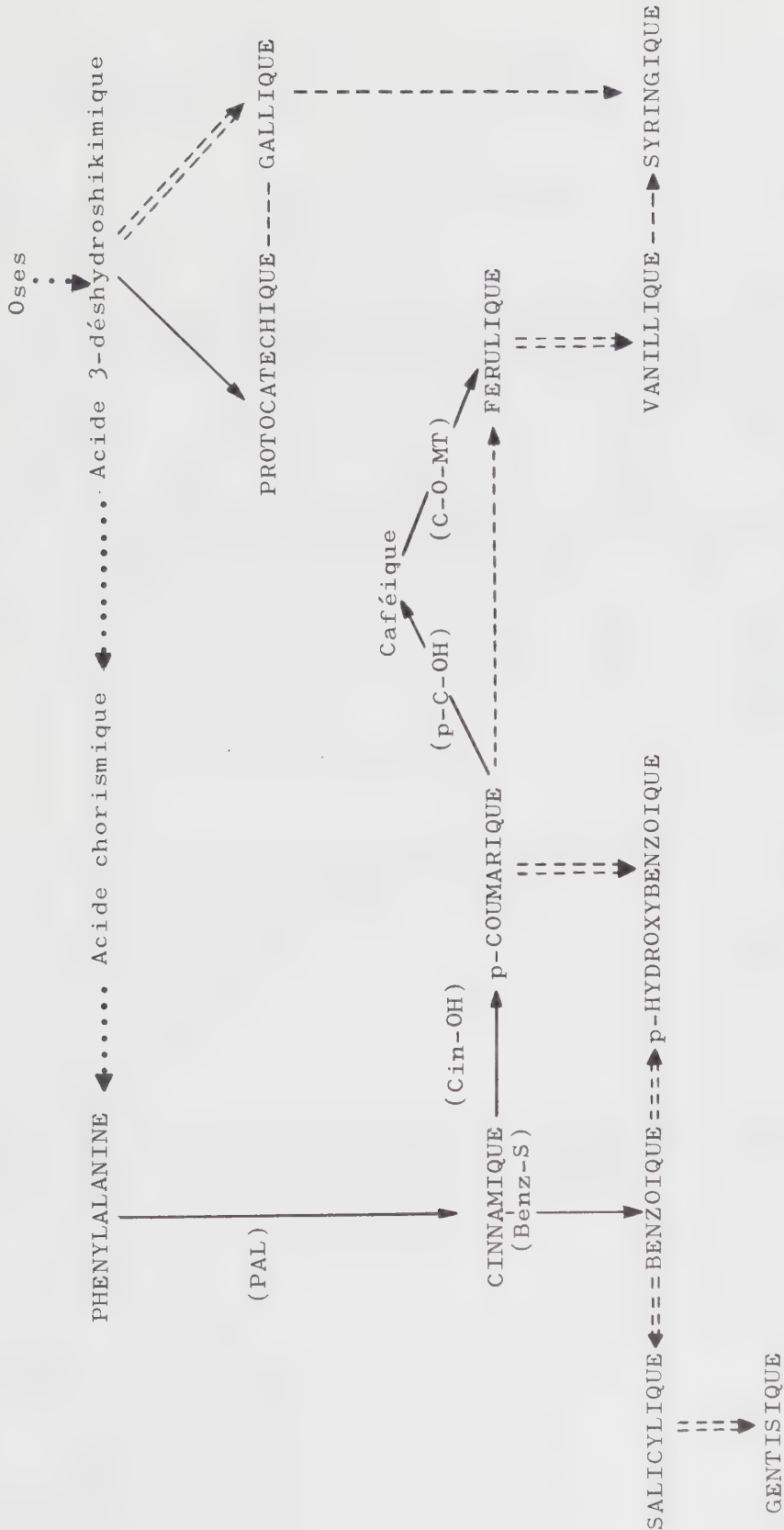
Le schéma biosynthétique proposé, correspond dans ses grandes lignes aux idées généralement admises sur la formation des acides phénols (EL BASYOUNI et al., 1964 b ; PRIDHAM, 1965). Cependant, il est à remarquer que parmi toutes les possibilités démontrées chez d'autres végétaux, seules quelques voies sont fonctionnelles chez le Chêne. Ainsi, les acides gallique et protocatéchique ne se forment qu'à partir de l'acide 3-déshydroshikimique (et non par hydroxylation de l'acide p-hydroxybenzoïque) ; de même l'acide vanillique n'est issu que de l'acide férulique (la méthylation de l'acide protocatéchique n'apparaissant pas ici possible). Il est probable que chaque végétal mette en oeuvre des voies biosynthétiques spécifiques, les plantes ayant sélectionné au cours de l'évolution la solution la mieux adaptée à leur survie en fonction de leur état (herbacé, arborescent, etc...) et des conditions de l'environnement.

D'un point de vue particulier, la formation des différents termes de la série cinnamique est démontrée simultanément par les expériences radiochimiques et enzymatiques ; les études cinétiques ayant permis de proposer une variante possible pour la biosynthèse de l'acide férulique.

Pour les composés en C_6-C_{11} , la biosynthèse de l'acide benzoïque à partir de l'acide cinnamique est confirmée par la mise en évidence pour la première fois in vitro de la "benzoate synthase"

TABLEAU XXXI

Les différentes voies de biosynthèse des acides phénoliques chez Quercus pedunculata (Ehrh..)



Bien que les systèmes enzymatiques catalysant la formation des acides p-hydroxybenzoïque et vanillique à partir des acides p-coumarique et férulique, n'aient pas été envisagés, il semble probable que ces substances se forment de la même façon. Il reste malgré tout à élucider la nature du mécanisme qui assure cette réaction : β -oxydation du type acides gras (nécessitant une activation préalable par le coenzyme A) ou oxydation directe.

Enfin, la mise en évidence de la PAL et des deux enzymes menant directement soit aux unités en C_6-C_3 (la Cin-OH) soit aux unités en C_6-C_1 (la "benzoate synthase") met bien en relief la position clef occupée par l'acide cinnamique dans la biosynthèse de ces deux séries de composés. Si le contrôle de la formation de cet acide a déjà fait l'objet de nombreuses études (ZUCKER, 1965, 1972 ; ENGELSMA, 1967 a, 1967 b et 1968 a, 1968 b, 1972 ou encore HAHNBROCK et al., 1971), les phénomènes de régulation qui président à la distribution ordonnée du noyau benzénique de l'acide cinnamique, entre les différentes séries phénoliques qui en dérivent, restent peu connus. Ils feront l'objet du dernier chapitre de ce travail.

CHAPITRE IV

REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES ACIDES PHENOLIQUES

- I.- MISE EN EVIDENCE DE DEUX FORMES ISOFUNCTIONNELLES DE LA PAL DANS LES JEUNES RACINES DE *Quercus pedunculata*
- II.- REGULATION in vitro DES DEUX FORMES ISOFUNCTIONNELLES DE LA PAL PAR LES ACIDES PHENOLIQUES
- III.- LOCALISATION INTRACELLULAIRE DE LA PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE, DE LA CINNAMATE-4-HYDROXYLASE ET DE LA "BENZOATE SYNTHASE"
 - 1.- Séparation des organites cellulaires à partir de jeunes racines de Chêne
 - a - Le milieu d'extraction et le broyage
 - b - Séparation des organites cellulaires
 - c - Purification des différentes fractions cellulaires obtenues
 - 2.- Localisation intracellulaire de la PAL
 - a - Réalisation des essais enzymatiques
 - b - Recherche de l'activité PAL dans les fractions cellulaires isolées
 - c - Localisation intracellulaire des deux formes isofonctionnelles de la PAL
 - 3.- Localisation intracellulaire de la cinnamate-4-hydroxylase et de la "benzoate synthase"
 - a - Localisation intracellulaire de la cinnamate-4-hydroxylase
 - b - Localisation intracellulaire de la "benzoate synthase"
 - 4.- Discussion
- IV.- FORMATION SEQUENTIELLE, A PARTIR DE LA PHENYLALANINE, DES ACIDES CINNAMIQUE, p-COUMARIQUE ET CAFEIQUE, PAR UNE FRACTION MICROSO-MALE ISOLEE
 - 1.- Méthodes utilisées
 - 2.- Résultats
- V.- DISCUSSION GENERALE

CHAPITRE IV

REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES ACIDES PHENOLIQUES

La connaissance biochimique des êtres vivants a commencé par l'étude des constituants et des étapes enzymatiques qui interviennent dans les différentes voies métaboliques. Depuis quelques années, la biologie s'oriente vers l'élucidation des mécanismes qui permettent à un individu de contrôler son métabolisme en fonction de ses besoins du moment et de s'adapter aux conditions du milieu où il vit. Ces phénomènes sont regroupés sous le terme général de régulation.

Les études menées à ce jour chez les végétaux supérieurs, mais surtout chez des bactéries et des champignons unicellulaires, ont montré que "la régulation enzymatique" était l'élément de base de ce mécanisme ; cette intervention au niveau des biocatalyseurs peut dans certains cas être complétée par une compartimentation intracellulaire des voies métaboliques.

D'après KLEINSMITH (1972), la "régulation enzymatique" s'effectue selon deux modalités fondamentales :

- le contrôle du taux d'enzyme intracellulaire (biosynthèse et dégradation des protéines catalytiques),
- la modification de l'activité des enzymes synthétisées (modifications chimiques de la molécule, formes actives et inactives des biocatalyseurs, disponibilité de cofacteurs, contrôle allostérique, etc...).

Dans le cadre de ce type d'action, les modifications de niveau d'activité par contrôle allostérique ont été les plus étudiées : les effecteurs (en général les produits finaux des chaînes métaboliques), en se fixant au niveau d'un site privilégié sur la protéine catalytique, différent de celui du substrat, entraînent des variations de l'activité de l'enzyme (théories du contrôle allostérique développées principalement par MONOD et al., 1965 ; KOSHLAND et al., 1966 ; RICARD et al., 1974).

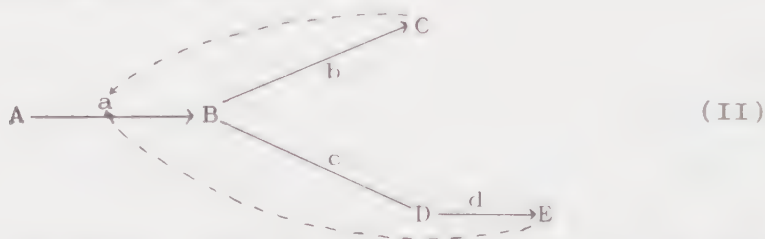
Ce contrôle est largement efficace pour les chaînes métaboliques linéaires : soit la séquence A , B, C, D, E catalysée

par les enzymes a, b, c, d,



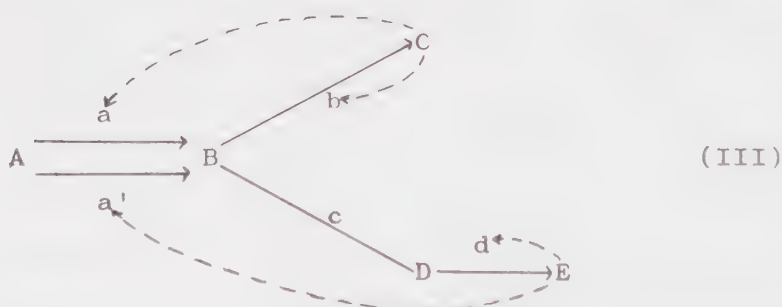
Le produit final E, agissant sur l'enzyme a, par effet allostérique régule sa propre synthèse.

Ce mécanisme se révèle imparfait pour le contrôle des chaînes métaboliques branchées :



En effet, dans ce cas un excès de C, en réduisant l'activité de l'enzyme a, se répercute au niveau de E.

Pour remédier à cette insuffisance, la cellule peut faire appel à des isoenzymes, régulées spécifiquement par les produits finaux des chaînes réactionnelles :



Les composés C et E rétroinhibent spécifiquement les isoenzymes a et a' ainsi que les deux biocatalyseurs b et d directement à l'origine des produits finaux. Dans ce système (mis en oeuvre par exemple par Escherichia coli dans le cas de la biosynthèse des acides aminés aromatiques, STADTMAN, 1968), C intervenant seulement sur a et b, n'affecte pas la séquence A, B, D, E.

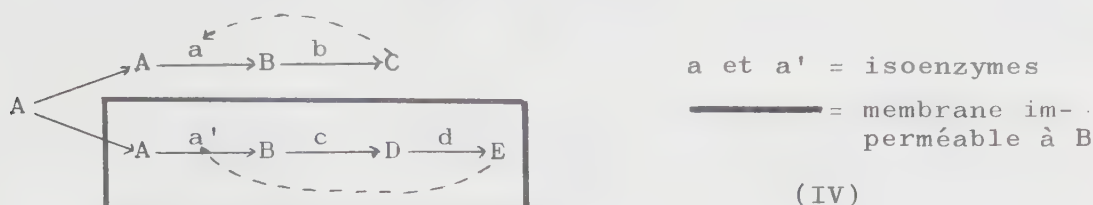
Une autre modalité peut également être développée par la cellule : il s'agit de la compartmentation des voies métaboliques. Ce phénomène permet d'isoler différents "pools" d'un même composé participant à des séquences réactionnelles compétitives.

OAKS et BIDWELL (1970) distinguent deux types de compartiments :

- les compartiments clos ("tight compartment") limités par une membrane, représentés principalement par les organites cellulaires : ce type d'organisation entraînant une séparation spatiale des voies métaboliques, implique obligatoirement les notions

de perméabilité cellulaire sélective aux molécules substrats et d'échanges entre compartiments.

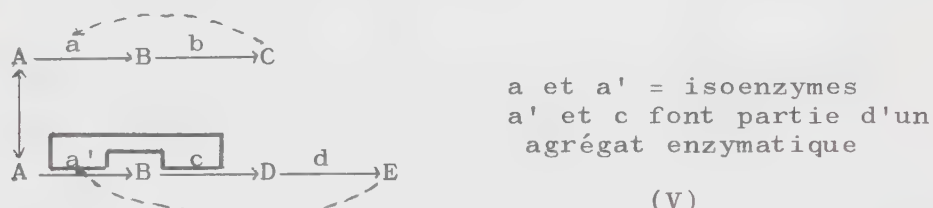
On peut schématiser cette possibilité de la façon suivante :



Les réactions catalysées par $a' - c - d$ et $a - b$ s'effectuent dans des compartiments cellulaires différents, B représentant un intermédiaire commun aux deux voies. Les isoenzymes a et a' ne réagissent qu'à l'accumulation des produits finaux formés dans leur propre compartiment (C et E). L'intérêt de ce système est de séparer deux "pools" du composé B, chacun impliqué dans la biosynthèse de C ou de E.

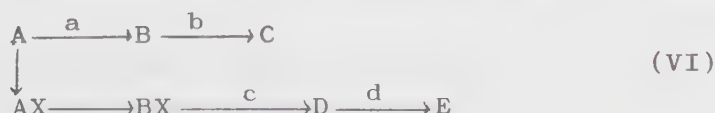
- les microcompartiments (non limités par des membranes), aboutissant à la canalisation ("channeling") des voies métaboliques.

Ces microcompartiments sont représentés par les agrégats enzymatiques (ou complexes enzymatiques) :



a et a' sont rétroinhibés spécifiquement par C et E et lorsque les molécules de A arrivent au contact de l'enzyme a' , elles sont transformées directement en D par le complexe enzymatique $a' - c$. B venant de l'action de a ne peut pénétrer dans l'agrégat et ainsi E ne peut se former que par l'action initiale de l'enzyme a' (une telle situation a été mise en évidence chez la levure par LUE et KAPLAN, 1970 dans le cas de la biosynthèse du carbamyl phosphate et du carbamyl aspartate à partir de la glutamine du CO_2 et de l'ATP). Bien que présentant un intermédiaire commun B les deux chaînes sont en fait efficacement cloisonnées par l'intermédiaire du complexe enzymatique.

On obtient également une microcompartimentation par la ségrégation des métabolites engendrés par la présence de formes métaboliquement actives ou inactives d'un même composé :



Dans ce système en passant sous la forme activée AX, seules certaines molécules A pourront être transformées en E. On rencontre une régulation de ce type chez Escherichia coli dans le cas de la biosynthèse de l'arginine et de la proline à partir de l'acide glutamique (OAKS et BIDWELL, 1970).

Tous ces phénomènes de compartimentation ne visent en fait qu'à rendre efficaces les rétroactions spécifiques des deux isoenzymes par deux produits finaux différents, sans répercussion au niveau de l'intermédiaire commun issu des formes isofonctionnelles.

Chez les végétaux, la biosynthèse des métabolites primaires essentiels à la vie, fait appel à des voies métaboliques diverses (fixation photosynthétique du CO_2 , dégradation de réserves lipidiques ou amylacées, etc...) et l'étude de la régulation à ce niveau apparaît extrêmement difficile. Les unités phénoliques simples ne dérivent au contraire, pour la plus grande partie, que d'une seule réaction : la désamination de la phénylalanine. En raison de cette origine unique, ces voies de formation représentent un modèle plus simple pour la mise en évidence et la compréhension des mécanismes généraux de régulation.

Dans cette dernière partie, je décrirai les résultats obtenus au niveau des réactions qui, à partir de la phénylalanine, conduisent à la biosynthèse des acides des séries benzoïque et cinnamique.

I.- MISE EN EVIDENCE DE DEUX FORMES ISOFUNCTIONNELLES DE LA PAL DANS LES JEUNES RACINES DE Quercus pedunculata

A la suite des résultats de RANJEVA (1971), BOUDET et al. (1971) qui ont mis en évidence des formes multiples de la PAL dans les feuilles de Chêne, j'ai recherché s'il en était de même dans les racines de ce végétal.

Après chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose (figure 11) on constate que l'activité PAL se retrouve à deux niveaux : la première protéine catalytique est éluée pour des concentrations en NaCl de 60 mM (PAL I) et la seconde pour 115 mM (PAL II) (ALIBERT et al., 1972 a).

Cette détection dans le système racinaire du Chêne de deux protéines capables d'effectuer la désamination de la phénylalanine est en accord avec les résultats initiaux obtenus au laboratoire sur les feuilles. La présence de deux formes au moins de la PAL chez le Chêne apparaît donc générale dans les différents organes du végétal.

A ce stade, il semble intéressant de commenter ces résultats en fonction de quelques publications récentes sur ce sujet. Les premières mentions sur la présence possible de formes multiples de

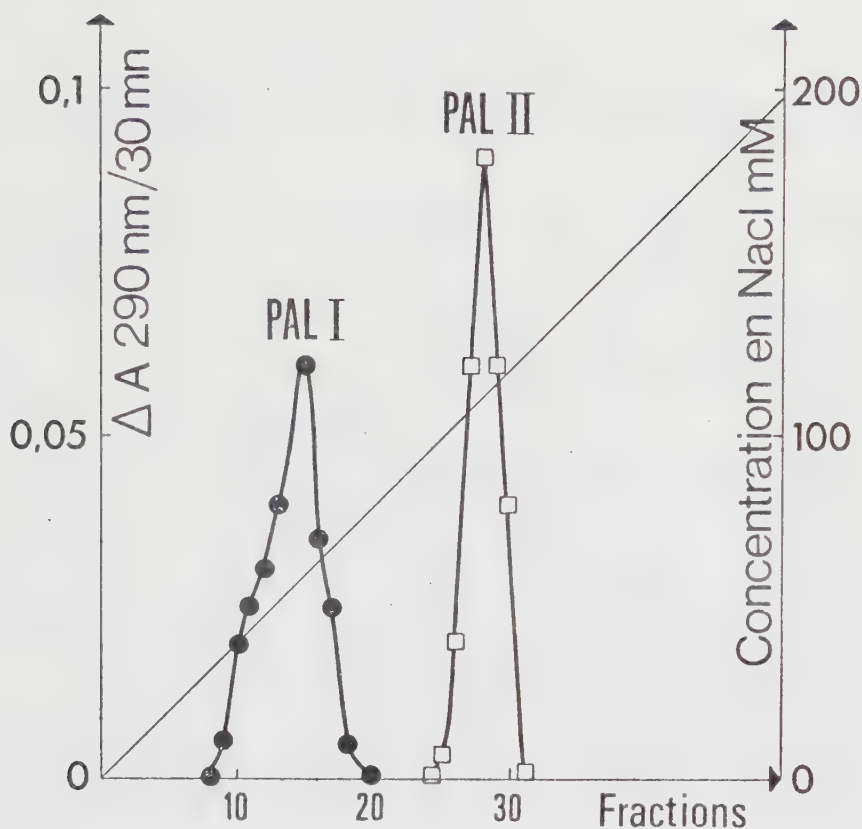


Figure 11 - Séparation des deux formes isofonctionnelles de la PAL par chromatographie sur DEAE-cellulose d'un extrait enzymatique obtenu à partir de racines de Chêne.

La solution enzymatique brute est dessalée sur colonne de Sephadex G 50 puis déposée sur une colonne de DEAE-cellulose (20 x 1,2 cm) préparée dans le tampon Tris-HCl 0,01 M, pH 8. L'élution s'effectue par un gradient linéaire de concentration saline (250 ml de tampon Tris-HCl 0,01 M de pH 8, enrichis progressivement par un volume identique de ce même tampon mais contenant du NaCl à la concentration de 0,2 M). Débit, 1 ml/mn, fractions 10 ml. L'activité enzymatique de chaque fraction est appréciée spectrophotométriquement par mesure de l'absorbance à 290 nm due à l'apparition de l'acide cinnamique (ZUCKER, 1965).

cette enzyme chez les végétaux sont dues à ZUCKER (1965) puis à MINAMIKAWA et URITANI (1965 a et b). Cependant, SHOPFER (1971) chez Sinapis ne pouvant identifier qu'une seule PAL suggérait alors que la mise en évidence de formes multiples de cette enzyme devait relever de l'artefact de manipulation.

En fait, dans l'état actuel de nos connaissances il semble plutôt que l'on puisse distinguer chez les végétaux trois cas différents :

- les Monocotylédones chez lesquelles une seule activité PAL est détectable (NARI et al., 1972), toujours associée à la TAL (tyrosine ammonia-lyase : HAVIR et al., 1971), et parfois inducible par la lumière (Mac CLURE, 1974).

- les végétaux chez lesquels il n'a pas été mis en évidence de formes multiples de l'enzyme : Fagopyrum (AMRHEIN et ZENK, 1971), Sinapis (SHOPFER, 1971), Glycine (HAHLBROCK et al., 1971), Oenothera (HACHTEL, 1972), Pisum (ATTRIDGE et SMITH, 1973).

- les plantes où deux PAL semblent coexister : Ipomea (MINAMIKAWA et URITANI, 1965 a et b), Raphanus (HUAULT, 1970 ; Phaseolus (AHMED et SWAIN, 1970), Quercus (RANJEVA, 1971), Fagus (KOUASSI, 1973), Robinia (PODSTOLSKI et BROWN, 1974).

Il apparaît également, à partir de données bibliographiques, que les espèces étudiées à ce jour possédant deux PAL distinctes correspondent en grande partie au type arborescent. Une étude systématique chez un nombre plus important d'individus pourrait sans doute permettre d'apprécier la généralité de cette constatation.

II.- REGULATION in vitro DES DEUX FORMES ISOFONCTIONNELLES DE LA PAL PAR LES ACIDES PHENOLIQUES

Dans les phénomènes de régulation classique, tels qu'ils apparaissent après les nombreuses études effectuées chez les micro-organismes, l'activité des enzymes situées en début d'une chaîne métabolique est toujours contrôlée par les produits finaux de cette chaîne. J'ai donc recherché quelle pouvait être l'action des acides des séries benzoïque et cinnamique sur les deux iso-enzymes de la PAL (tableau XXXII).

Le produit de la réaction, l'acide cinnamique, inhibe l'activité des deux biocatalyseurs. En revanche, les unités benzoïques (représentées par les acides benzoïque et vanillique) n'ont une action inhibitrice que sur la PAL I ; la PAL II se révélant à

l'inverse sensible seulement aux unités cinnamiques (acide caféique en particulier). L'acide gallique enfin, présente la propriété d'activer les deux formes isofonctionnelles.

TABLEAU XXXII

Influence des acides phénoliques des séries benzoïque et cinnamique sur l'activité des deux formes isofonctionnelles de la PAL des racines de Chêne

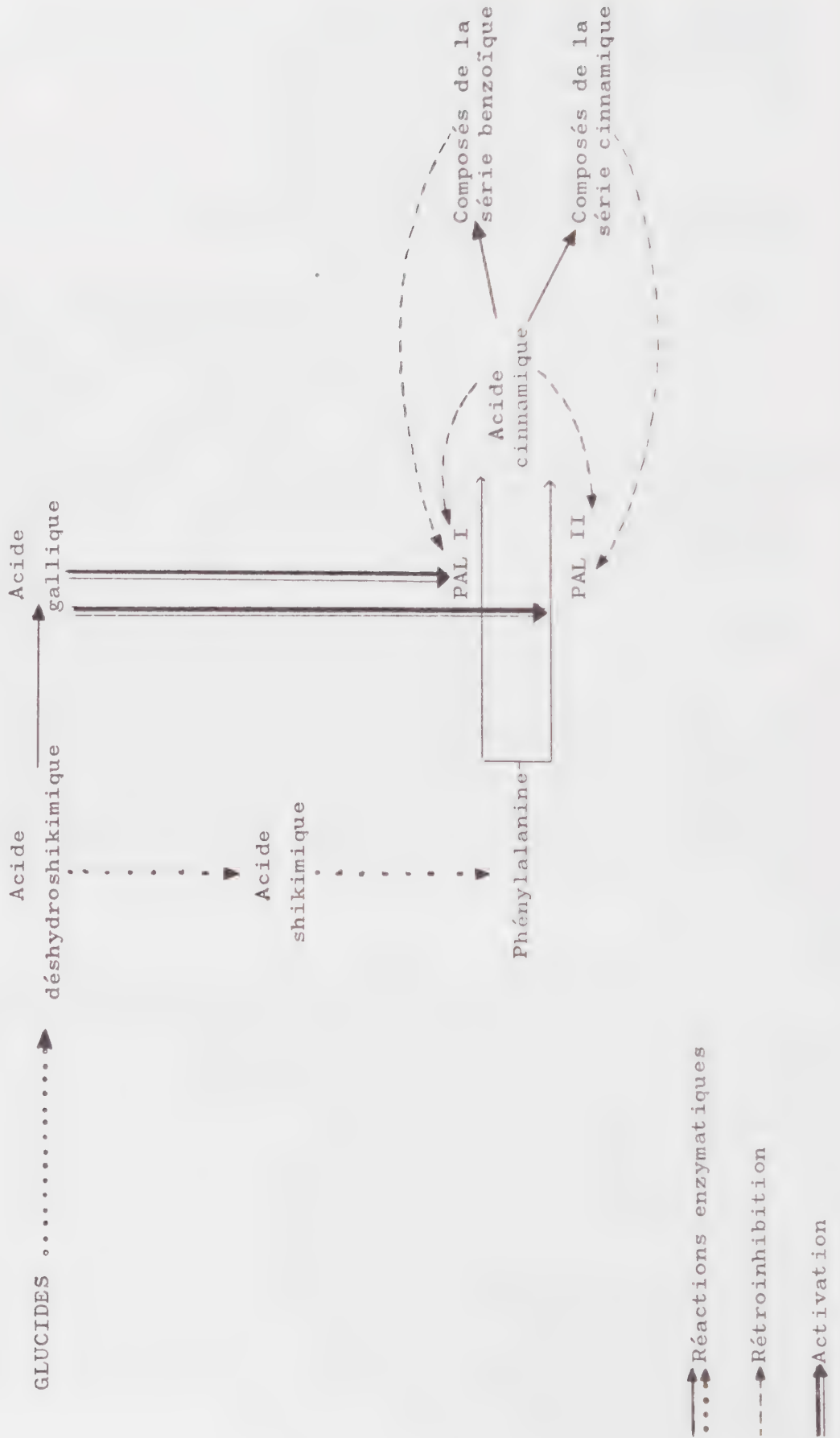
Acides phénoliques (7 x 10 ⁻⁴ M)	Activité en % d'un essai effectué sans effecteur	
	PAL I	PAL II
Cinnamique	42	42
Caféique	100	70
Benzoïque	45	100
Vanillique	0	100
Gallique	226	186

En fonction des résultats précédemment obtenus par BOUDET et al. (1971) chez les feuilles, j'ai étudié principalement l'action des acides benzoïque - vanillique (série benzoïque), cinnamique - caféique (série cinnamique) et de l'acide gallique. Après avoir réuni les fractions correspondant à chacun des deux pics enzymatiquement actifs, on effectue un essai radiochimique comme il est indiqué dans le tableau XXIV. Chaque acide phénolique est mis en contact préalablement pendant 15 mn avec la solution enzymatique, la réaction débutant par l'adjonction du substrat.

On trouve donc réunis, au niveau de la PAL, les éléments de régulation schématisés dans la réaction (III) (voir introduction): les produits finaux de deux voies métaboliques issues d'un même précurseur sont capables de rétroinhiber spécifiquement chacune des deux isoenzymes situées en tête de la chaîne branchée. Un phénomène supplémentaire de régulation se superpose ici, l'activation par l'acide gallique, d'origine métabolique différente. Il s'agit de ce que JENSEN (1969) nomme "metabolic interlock", c'est à dire des "interactions régulatrices s'exerçant entre différentes chaînes biosynthétiques". Il est probable que l'accumulation d'acide gallique in vivo puisse, en activant la PAL, dévier le flux métabolique provenant des acides alicycliques vers

TABLEAU XXXIII

La régulation enzymatique au niveau de la phénylalanine ammonia-lyase
(selon BOUDET, 1972)



les unités phénoliques dérivant de la phénylalanine (tableau XXXI).

Ces résultats semblent mettre en évidence les premiers éléments d'un système de régulation au niveau de la PAL pour le contrôle de la formation des acides des séries cinnamique et benzoïque. On peut, en effet, penser que la PAL I (tableau XXXIII), essentiellement sensible aux acides de la série en C_6-C_1 est principalement engagée dans la biosynthèse de ces unités alors que la PAL II, inhibée par les acides en C_6-C_3 est à l'origine des acides cinnamiques selon un mécanisme analogue à celui déjà rencontré dans les parties aériennes du même végétal (BOUDET et al., 1971). Ce système, comme nous l'avons vu, reste cependant encore imparfait dans la mesure où les molécules d'acide cinnamique, issues de chacune des deux isoenzymes, ne seraient pas introduites irréversiblement soit dans la biosynthèse des acides benzoïques, soit dans celle des acides cinnamiques par un système de compartimentation quelconque des métabolites.

Parmi les trois possibilités de régulation complémentaires envisagées précédemment : compartimentation des voies métaboliques dans des compartiments clos (organites cellulaires), présence de complexes multienzymatiques ou de formes métaboliquement actives différentes, la première m'a paru représenter un cadre plus général dans lequel les deux autres processus pouvaient également s'exercer. L'exemple de la malate déshydrogénase dont les isoenzymes présentent une localisation intracellulaire différente (ROCHA et TING, 1971) m'a incité à rechercher s'il en était de même pour les deux formes isofonctionnelles de la phénylalanine ammonia-lyase.

III.- LOCALISATION INTRACELLULAIRE DE DEUX FORMES ISOFUNCTIONNELLES DE LA PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE, DE LA CINNAMATE-4-HYDROXYLASE ET DE LA "BENZOATE SYNTHASE"

1.- Séparation des organites cellulaires à partir de jeunes racines de Chêne

En vue de mettre en évidence une éventuelle compartimentation intracellulaire des voies de biosynthèse des acides phénoliques, j'ai envisagé de séparer :

- une fraction contenant principalement des mitochondries et des "microbodies"*,

* Le terme de "microbodies" est attribué à des organites cellulaires limités par une seule membrane. TOLBERT (1971) englobe sous cette dénomination les "peroxysomes" et les "glyoxysomes".

- une fraction microsomale correspondant aux systèmes membranaires de la cellule (reticulum endoplasmique, membranes plasmique et vacuolaire, appareil de golgi, etc...).

Les racines de Chêne ne contenant pas de chloroplastes, le problème de ces organites et des contaminations des autres fractions qu'ils occasionnent en général (DOUCE et al., 1968), était par avance résolu.

a - Le milieu d'extraction et le broyage - Des extractions réalisées à l'aide de milieux classiquement utilisés (BONNER, 1967 ; BAHL et al., 1970) ont conduit à l'obtention d'organites totalement dépourvus d'activité enzymatique. Ce phénomène vraisemblablement provoqué par la présence de nombreux polyphénols a pu être évité par l'adjonction, au milieu d'extraction, de protecteurs du type polyéthylèneglycol ou polyvinylpyrrolidone (JONES et al., 1964).

En fonction des méthodes d'extraction proposées par différents auteurs : HULME et al. (1964), TOLBERT et al. (1969), HUANG et BEEVERS (1971), TRELEASE et al. (1971) et ROCHA et TING (1971), j'ai retenu le milieu suivant : mannitol 0,5 M, tampon Tris-HCl 0,01 M (pH 7,3), EDTA 0,01 M, cystéine - HCl 0,01 M, albumine* 1 g/l, PEG (6 000) 5 g/l, Polyclar AT** 10 g/l . Les extractions sont réalisées à raison de 100 g de jeunes racines fraîchement récoltées par litre de milieu d'extraction.

Pour l'obtention d'organites le moins endommagés possible, le type de broyage appliqué au matériel végétal, est primordial. Après de nombreux essais préliminaires j'ai retenu un broyage au Turmix : les racines sont d'abord finement coupées par action du broyeur pendant une minute à la vitesse 2 puis on fait éclater les cellules à une vitesse supérieure (cinq secondes à la vitesse 3).

b - Séparation des organites cellulaires -

On filtre tout d'abord le broyat sur gaze médicale puis on centrifuge 15 mn à 1 500 x g (MSE HS 18, rotor 30). On précipite ainsi les débris cellulaires et les tissus non broyés.

On centrifuge enfin 20 mn à 10 000 x g, de façon à séparer les organites intacts (fraction "F 10 000") qui précipitent, puis

* Serum albumine bovine "fatty acid poor", CALBIOCHEM : sert à fixer les acides gras, inhibiteurs enzymatiques libérés par les membranes.

** Le Polyclar, préparé comme précédemment est préalablement centrifugé à plusieurs reprises en milieu aqueux pour éliminer les particules les plus fines (15 mn à 1 000 x g p/v = 1/10).

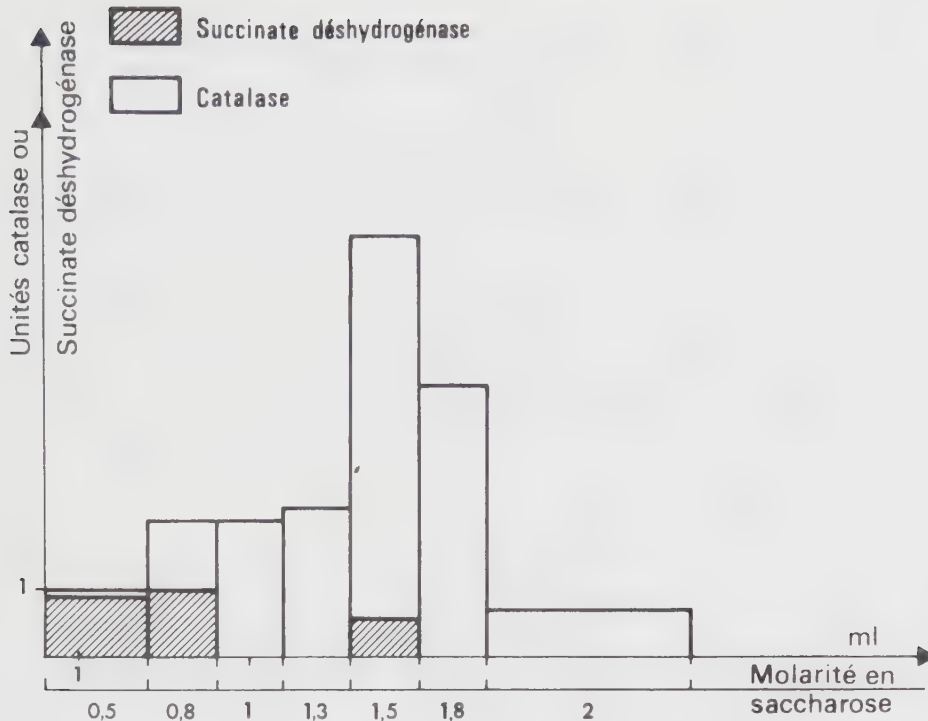


Figure 12 - Position des mitochondries et des "microbodies" sur barrières de densité de saccharose, déterminée par la mesure des activités succinate déshydrogénase et catalase.

- On dispose sur le gradient discontinu de saccharose 3 ml de la suspension d'organites. Après 4 heures à 100 000 x g (MSE Super Speed 65) on récupère par la base du tube des fractions de 2 ml sur lesquelles on détermine les activités des enzymes marqueurs.
- L'activité succinate déshydrogénase est appréciée selon le protocole expérimental de HULME et al. (1964).
- L'activité de la catalase est mesurée selon LUCK (1965).
- Une unité succinate déshydrogénase ou catalase = variation d'absorbance de 0,01 par minute, lorsque la réaction est d'ordre nul.

à 100 000 x g (SPINCO modèle L, rotor 30) pour obtenir les "microsomes".

c - Purification des différentes fractions cellulaires obtenues - A partir de la fraction précipitée à 10 000 x g, je me suis attaché plus particulièrement à obtenir les mitochondries et les "microbodies" qui la composent sans doute pour l'essentiel en raison des conditions expérimentales retenues (TOLBERT et al., 1969 ; BAHL et al., 1970).

Le culot "F 10 000" est repris par un milieu contenant : saccharose 0,5 M, tampon Tris-HCl 0,01 M (pH 7,3), EDTA 0,01 M et serum albumine 1 g/l , et déposé sur un gradient en palier de saccharose contenant par ailleurs les mêmes composants. On centrifuge alors pendant 4 heures à 100 000 x g (MSE Super Speed 65 (TOLBERT et al., 1969 ; ROCHA et TING, 1971)).

Il est possible de déterminer la position dans le gradient des deux organites étudiés par la mesure d'enzymes marqueurs. J'ai retenu la succinate déshydrogénase pour les mitochondries et la catalase pour les "microbodies" (SHNITKA et SELIGMAN, 1971). La figure 12 donne le diagramme obtenu après la centrifugation.

Au cours des manipulations qui précèdent la centrifugation, un certain nombre d'organites éclatent et libèrent, d'une part des enzymes solubles, et d'autre part, des membranes. Ces deux éléments sont responsables des activités enzymatiques relevées dans les fractions 0,5 et 0,8 M. En revanche, les organites intacts, plus denses, migrent dans le gradient jusqu'à atteindre une position d'équilibre et se retrouvent ainsi chez le Chêne essentiellement au niveau de la fraction 1,5 M.

J'ai donc retenu pour la suite du travail une barrière de densité 0,5 M-1 M, en saccharose et une centrifugation de 1 heure à 100 000 x g (SPINCO Modèle L, rotor 40). Dans ces conditions les membranes et les enzymes solubles restent dans la solution légère, les organites intacts passant au contraire dans la fraction 1 M.

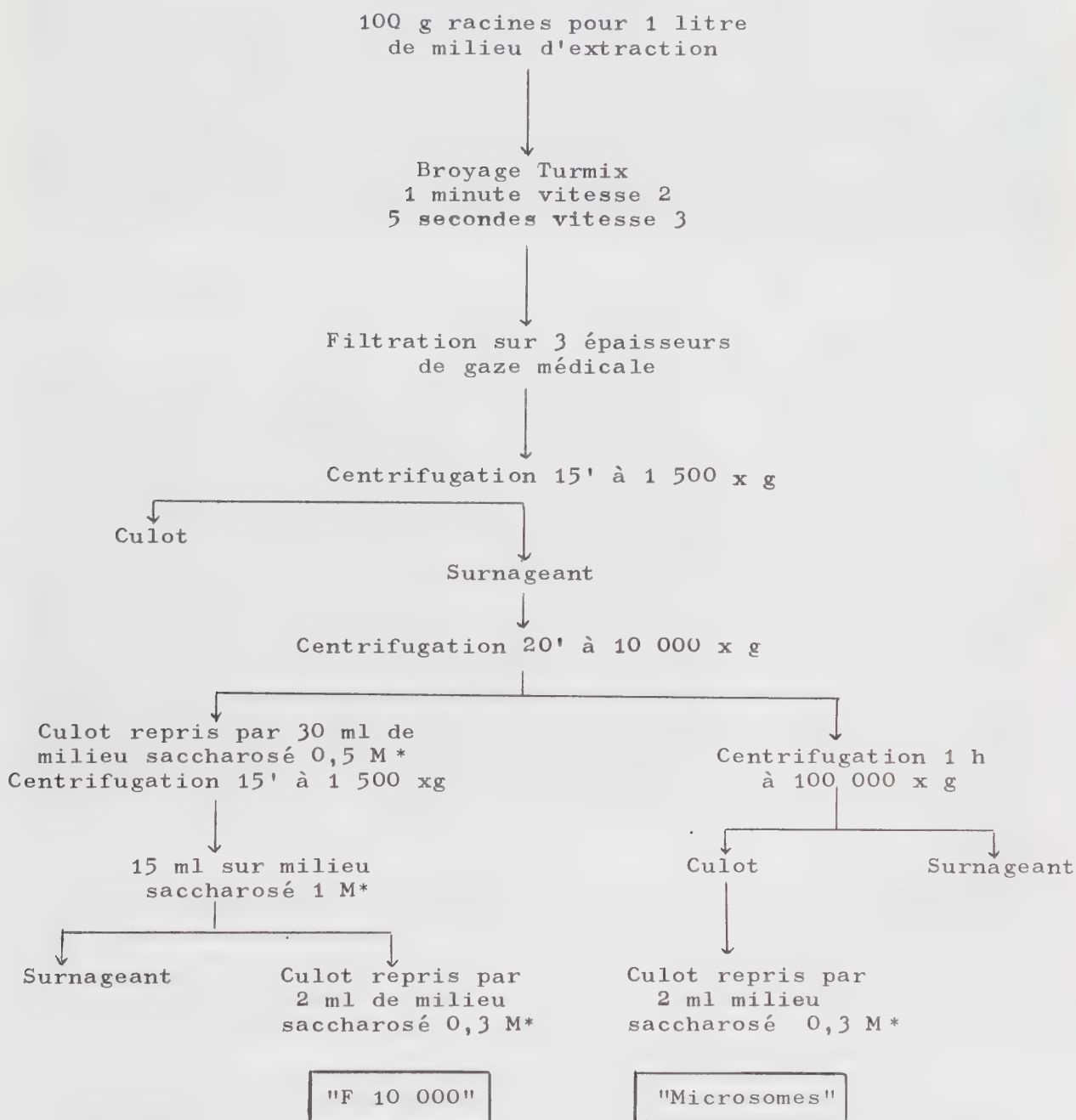
Les microsomes constitués de membranes n'ont subi aucune purification supplémentaire.

Les culots "F 10 000" et "microsomes" sont finalement repris par une solution isotonique de saccharose (0,3 M).

L'ensemble du protocole retenu pour obtenir ces deux fractions cellulaires est donné dans le tableau XXXIV.

TABLEAU XXXIV

Protocole définitivement retenu pour la séparation des organites cellulaires chez le Chêne (toutes les opérations s'effectuent à des températures comprises entre 0 et 4° C)



* Les différents milieux saccharosés contiennent également du tampon Tris-HCl 0,01 M (pH 7,3), EDTA 0,01 M, SAB 1 g/l.

- Pureté des fractions isolées, contrôle en microscopie électronique

Le tableau XXXV donne la répartition des deux enzymes marqueurs : la succinate déshydrogénase et la catalase, dans les fractions isolées.

TABLEAU XXXV

Activités totales et activités spécifiques des deux enzymes "marqueurs" dans les fractions cellulaires isolées

	Azote total*	Suc. déshydrogénase Act.tot**	Act. spe:**	Catalase Act. tot**	Act. spe:**
"F 10 000"	113	35	0,31	203	1,8
"Microsomes"	186	10	0,05	98	0,53

* µg d'azote

** unités déterminées comme figure 12

*** unités par µg d'azote.

L'analyse de ces résultats met en évidence des différences fondamentales entre les deux fractions isolées :

- la mesure des activités des enzymes "marqueurs" exprimée en activité spécifique (représentant la richesse en ces biocatalyseurs par rapport aux autres protéines) démontre que "F 10 000" est bien constituée de mitochondries et de "microbodies". Ces données biochimiques sont d'ailleurs confirmées par l'observation du culot "F 10 000" en microscopie électronique* (planche 2). Les activités enzymatiques relevées au niveau des microsomes indiquent une contamination de cette fraction par les organites de "F 10 000" ; il faudra donc en tenir compte dans l'interprétation ultérieure des résultats.

Remarque. - La mesure de l'activité totale montre que la succinate déshydrogénase (essentiellement membranaire) est détectable au niveau de "F 10 000" et des "microsomes" (contaminés par des fragments de mitochondries). La catalase pour la plus grande partie soluble (HUANG et BEEVERS, 1973) se retrouve dans le surnageant obtenu après centrifugation à 100 000 x g. L'activité mesurée au niveau de "F 10 000" représente donc la catalase encore contenue dans les "microbodies" intacts.

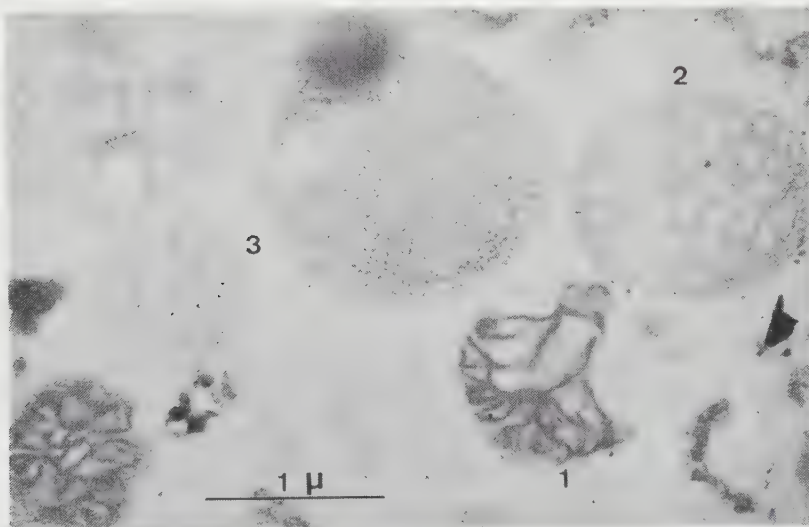
Cette constatation met en évidence la nécessité de l'expression des résultats en activité spécifique, condition essentielle à la compréhension des données obtenues dans le cas du métabolisme aromatique.

* Ce travail a été réalisé en collaboration avec M. R. DARGENT, Maître-Assistant au laboratoire de Cryptogamie de l'Université Paul Sabatier.



Vue générale du culot "F 10 000"

On observe dans cette fraction la présence de mitochondries (1) de "microbodies" (3) et quelques fragments de membrane (4).



Mitochondries (1 et 2)
dans divers états de
conservation,
"microbodies" (3)

PLANCHE 2

Observation en microscopie électronique de la fraction "F 10 000"

- Fixation glutaraldéhyde 25 % (2 h), ac. osmique 4 % (1 h)
- Inclusion dans la gélose
- Déshydratation : éthanol 20-40-60-75-80-95 % (15 mn)
éthanol absolu 2 fois 30 mn
oxyde de propylène 2 fois 30 mn
- Inclusion dans Epon 812
- Coupe ultramicrotome Reichert Om U 3
- Contrastant uracyl-acétate-citrate de plomb sur grille en cuivre de 200 mesh
- Observation : microscope Hitachi Modèle HU 11 b
- Grossissement 24 000.

2.- Localisation intracellulaire de la PAL

a - Réalisation des essais enzymatiques - Les déterminations effectuées à l'aide d'organites cellulaires sont en tout point comparables à celles réalisées à partir d'extraits enzymatiques ; on ajoute simplement au milieu du saccharose (0,3 M) de façon à maintenir l'isotonie.

b - Recherche de l'activité PAL dans les fractions cellulaires isolées - Dans un premier temps j'ai recherché si l'activité PAL était seulement localisée dans une fraction cellulaire donnée.

Les deux fractions étudiées sont capables de désaminer la phénylalanine en acide cinnamique. Les résultats mentionnés dans le tableau XXXVI indiquent par ailleurs que l'activité spécifique la plus élevée se retrouve au niveau de la fraction microsomale. Il semble que l'on n'ait pas affaire à un phénomène de contamination des "microsomes" par une PAL localisée essentiellement dans "F 10 000", mais plutôt à la présence de deux formes différentes de l'enzyme dans chaque fraction cellulaire (voir en comparaison les résultats mentionnés dans le tableau XXXV).

TABLEAU XXXVI

Activité spécifique de la phénylalanine ammonia-lyase
pour les diverses fractions cellulaires isolées .

Fractions cellulaires	"F 10 000"	"Microsomes"
Act. spéc. (dpm/ μ g N ₂)	10	20

Remarque.- La PAL étant une enzyme soluble, une grande partie de l'activité se retrouve dans la fraction surnageante obtenue après centrifugation à 100 000 x g.

c - Localisation intracellulaire des deux formes isofonctionnelles de la PAL - Compte tenu de la spécificité de réponse aux effecteurs phénoliques de la PAL, j'ai réalisé les réactions de désamination en présence et en absence d'acide vanillique et caféique (ces deux composés ayant la propriété d'inhiber spécifiquement chacune des deux formes isofonctionnelles de l'enzyme). Le tableau XXXVII met en évidence la sensibilité différente du biocatalyseur présent dans "F 10 000" ou les "microsomes" aux deux

effecteurs phénoliques. En fonction des résultats précédemment obtenus (tableau XXXII) il apparaît que la PAL identifiée dans "F 10 000", sensible à l'acide vanillique doit correspondre à la PAL I des séparations sur DEAE-cellulose, celle présente dans les "microsomes", inhibée par l'acide caféique, étant en revanche assimilable à la PAL II.

TABLEAU XXXVII

Sensibilité aux effecteurs phénoliques de la phénylalanine ammonia-lyase, en fonction de la localisation cellulaire de l'enzyme

Fractions cellulaires	Essai + ac. vanillique*	Essai + ac. caféique*
"F 10 000"	4	90
"Microsomes"	70	40

* Concentration : 7×10^{-4} M

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité d'un essai réalisé sans effecteur.

A diverses reprises des indications concernant la présence de la phénylalanine ammonia-lyase dans des organites différents ont été obtenues : ainsi STAFFORD (1969) chez le Sorgho, puis AMRHEIN et ZENK (1971) chez le Sarrasin, signalaient l'existence d'une activité PAL dans les microsomes ; RUIS et KINDL (1971) localisaient au contraire l'enzyme dans les "microbodies", enfin, CAMM et TOWERS (1973 b) démontraient chez la Pomme de terre que le biocatalyseur était fermement lié à ces deux fractions cellulaires. Les résultats obtenus chez le Chêne vont dans le sens des données précédentes mais démontrent, en outre, pour la première fois qu'à une répartition intracellulaire spécifique correspondent des propriétés de régulation différentes de la phénylalanine ammonia-lyase (ALIBERT et al., 1972 a).

Enfin, les formes multiples de la PAL, mises en évidence chez Quercus, par leurs propriétés de régulation différentes et leur localisation intracellulaire spécifique, répondent à deux des critères retenus par SHAW (1969) pour distinguer les "isoenzymes primaires" (ou isoenzymes vraies), des "isoenzymes secondaires" (artefacts obtenus "in vitro"). Il semble que la PAL du Chêne puisse être classée, comme la malate déshydrogénase dans la catégorie des "formes multiples d'enzymes, sous groupe 1" (protéines génétiquement indépendantes) classification recommandée par "The In-

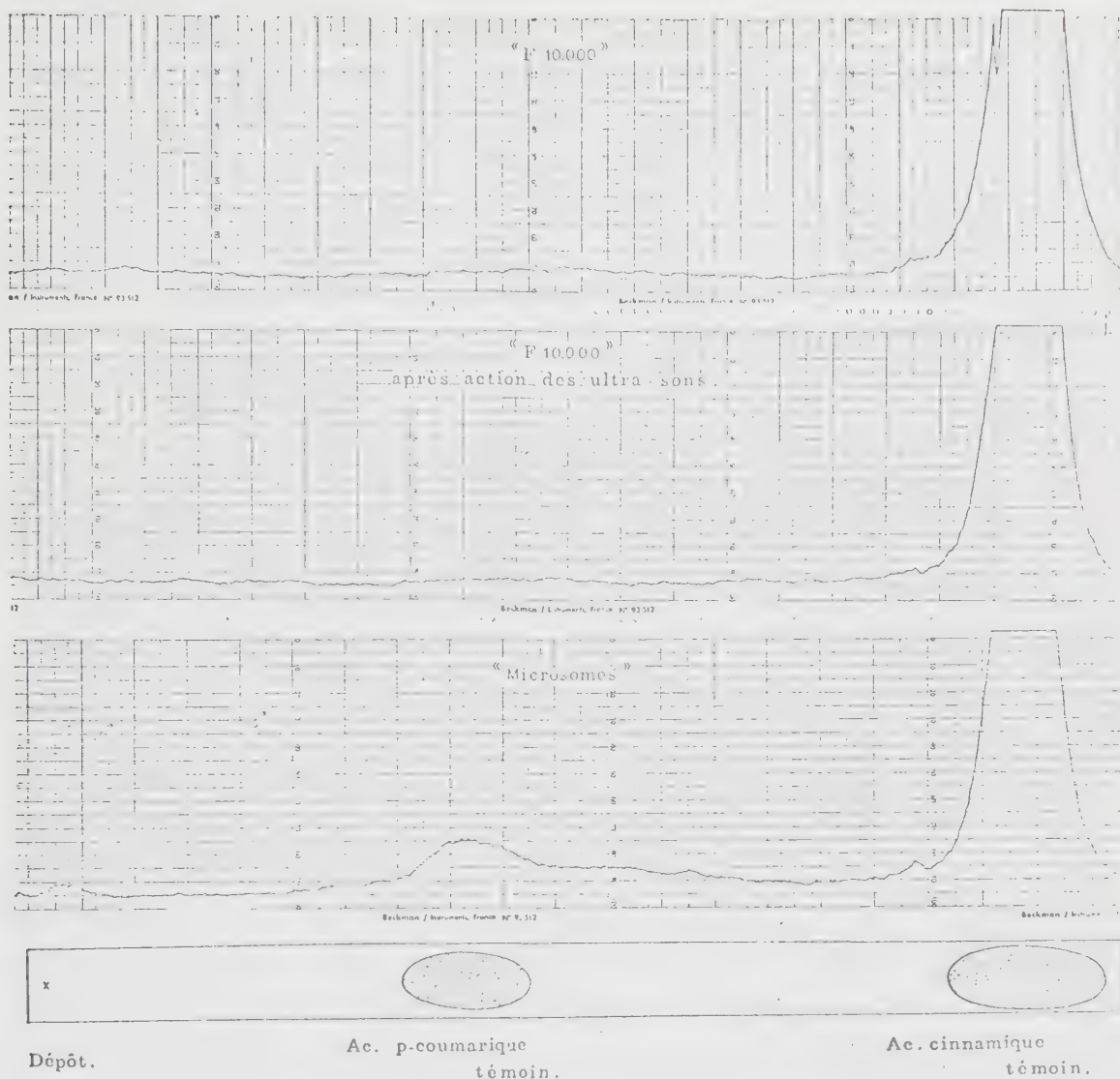


Figure 13 - Localisation intracellulaire de la cinnamate-4-hydroxylase. Enregistrement de la radioactivité sur les chromatogrammes réalisés dans le solvant benzène - acide acétique - eau (2-2-1 v/v).

ternational Union of pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry"*.

A la suite de résultats obtenus sur la phénylalanine ammonia-lyase, il était intéressant de déterminer si le devenir de l'acide cinnamique provenant de chaque isoenzyme différerait selon son lieu de synthèse. J'ai donc recherché la localisation intracellulaire des deux biocatalyseurs impliqués dans son utilisation : la cinnamate-4-hydroxylase et la "benzoate synthase" (tableau XXXI, page 109).

3.- Localisation intracellulaire de la cinnamate-4-hydroxylase et de la "benzoate synthase"

a - Localisation intracellulaire de la cinnamate-4-hydroxylase - Les réactions enzymatiques effectuées en présence d'acide cinnamique $^{14}\text{C}^{**}$ indiquent que ce biocatalyseur est exclusivement présent dans la fraction microsomale. En effet, la figure 13 montre l'absence d'acide p-coumarique dans les milieux réactionnels contenant "F 10 000", même lorsque cette dernière est soumise à l'action des ultrasons pour en détruire les structures organisées (on ne peut donc invoquer dans ce cas la non pénétration du substrat dans les organites).

Ces résultats concordent avec ceux de STAFFORD (1969), RUSSEL (1971), AMPHEIN et ZENK (1971), BUCHE et SANDELMANN (1973), ou encore BENVENISTE et DURST (1974) obtenus chez divers végétaux.

b - Localisation intracellulaire de la "benzoate synthase" - Le tableau XXXVIII donne l'activité spécifique de la "benzoate synthase" dans les fractions cellulaires isolées.

TABEAU XXXVIII

Localisation intracellulaire de la "benzoate synthase"*

Fractions cellulaires	"F 10 000"	"Microsomes"
Activité spécifique ($\mu\text{moles par mg N}_2$ en 60' de réaction)	4	0,8

* Les réactions enzymatiques sont réalisées comme page 106 mais en milieu saccharosé 0,3 M.

* Enzyme nomenclature - Recommandations (1972) of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry, éd., Elsevier (1972).

** Les réactions enzymatiques sont effectuées comme il est indiqué page 93 mais en présence de saccharose 0,3 M.

Il apparaît que ce biocatalyseur est nettement localisé dans "F 10 000", l'activité relevée dans les microsomes étant redevable d'une contamination inévitable de ces organites comme il a déjà été signalé.

En fonction des résultats obtenus par KINDL et RUIS (1971) selon lesquels des "microbodies" étaient capables de transformer l'acide p-coumarique en acide p-hydroxybenzoïque, il semble probable que chez le Chêne également, la β -oxydation de l'acide cinnamique s'effectue dans ces organites plutôt qu'au niveau des mitochondries. La séparation des deux types d'organites composant "F 10 000" devra être envisagée ultérieurement pour confirmer cette hypothèse.

4.- Discussion

L'ensemble des résultats obtenus au cours de la localisation intracellulaire des enzymes conduisant de la phénylalanine aux premiers termes de chacune des deux séries en C_6-C_1 et en C_6-C_3 met en évidence un mécanisme de régulation très sophistiqué de ces voies métaboliques. En effet, la phénylalanine ammonia-lyase I, rétroinhibée spécifiquement par les acides de configuration chimique de type benzoïque, est localisée dans la même fraction cellulaire que la "benzoate synthase" ; la phénylalanine ammonia-lyase II, sensible aux acides cinnamiques seulement, se trouve avec la cinnamate-4-hydroxylase, dans les microsomes. La coexistence des premières enzymes de chaque chaîne métabolique (en C_6-C_1 et en C_6-C_3) au sein d'un même compartiment suggère l'existence d'au moins deux lieux de synthèse des acides phénoliques dans la cellule. Les réactions conduisant de la phénylalanine aux différents composés de la série cinnamique s'effectueraient dans des structures cellulaires constituant la fraction microsomale, celles responsables de la formation de certains acides benzoïques se réaliseraient au niveau d'organites plus denses, sans doute les "microbodies" (KINDL et RUIS, 1971).

Nous avons vu que la régulation d'une chaîne métabolique branchée n'exerce une action réellement efficace que lorsque la mise en oeuvre d'isoenzymes est associée à des mécanismes complémentaires : rétroinhibition simultanée des biocatalyseurs situés près du point de branchement (STADTMAN, 1963 ; COHEN, 1965), canalisation des produits formés par l'intermédiaire d'une compartimentation intracellulaire des voies métaboliques. Les résultats obtenus ici démontrent l'existence de tels phénomènes de régulation au niveau du métabolisme des acides phénoliques chez Quercus pedunculata.

IV.- FORMATION SEQUENTIELLE, A PARTIR DE LA PHENYLALANINE, DES ACIDES CINNAMIQUE, p-COUMARIQUE ET CAFEIQUE, PAR UNE FRACTION MICROSOMALE ISOLEE

Pour tenter de confirmer cette notion de séparation des voies métaboliques, j'ai recherché si des microsomes isolés étaient capables de réaliser in vitro la série de réactions menant depuis la phénylalanine jusqu'aux termes hydroxylés des acides cinnamiques.

1.- Méthodes utilisées

Deux expériences ont été réalisées : dans la première, le substrat fourni était la phénylalanine et dans la seconde l'acide cinnamique. La composition des milieux réactionnels est donnée dans le tableau XXXIX.

TABEAU XXXIX

Composition des milieux réactionnels (volume final 3 ml)*

Composants du milieu	Expérience I (mM)	Expérience 2 (mM)
Phénylalanine U ¹⁴ C**	2,4	-
Cinnamique 3 ¹⁴ C***	-	3,3
NADPH	1	1
Acide ascorbique	10	10
Tampon Tris-HCl (pH 8)	100	100
Fraction microsomale	+	-

* Un prélèvement effectué au temps zéro et acidifié sert de témoin

** Radioactivité spécifique = 1,2 μ Ci/mMole

*** Radioactivité spécifique = 0,8 μ Ci/mMole

La présence du NADPH et de l'acide ascorbique est nécessaire pour obtenir une activité optimale des hydroxylases. D'autre part, la PAL, comme la cinnamate-4-hydroxylase et la 4-hydroxycinnamate-3-hydroxylase présente un pH optimum de 8 (deuxième optimum pour la p-C-OH). J'ai donc retenu cette valeur pour effectuer la réaction enzymatique.

Après des temps variables compris entre 0 et 240 minutes, on prélève 500 μ l du milieu réactionnel qu'on acidifie. Après extraction par l'éther éthylique, on évapore à sec et le résidu est repris par une solution éthanol absolu - acide acétique (99-1 v/v) contenant 25 μ g d'acide cinnamique, p-coumarique et caféique comme

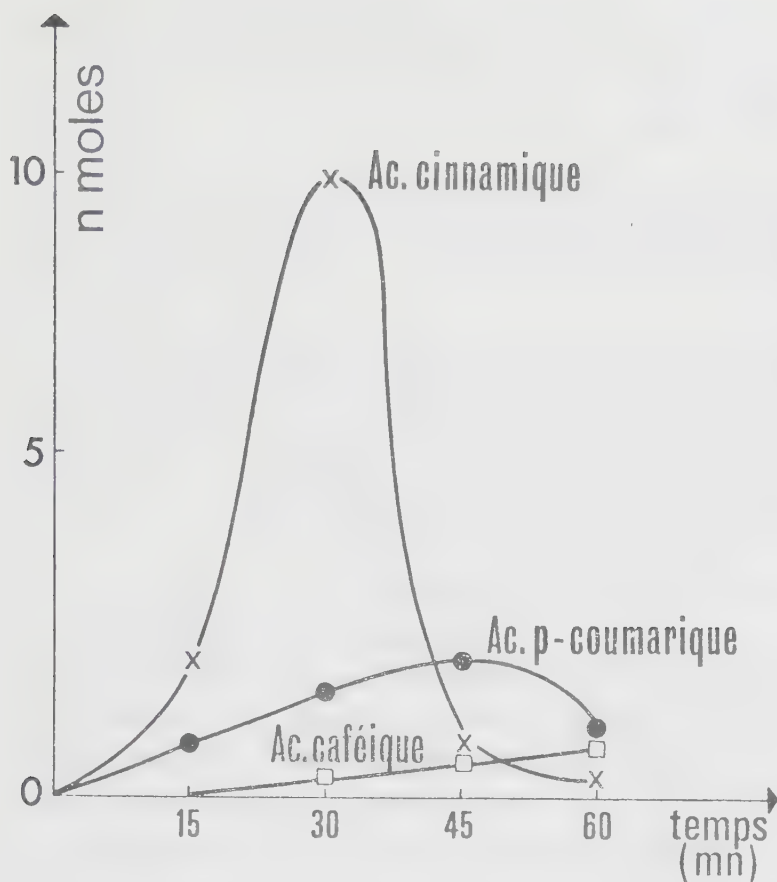


Figure 14 -

Formation séquentielle à partir de la PAL des acides cinnamique, p-coumarique et caféique par des "microsomes" (6,2 mg de protéines par essai).

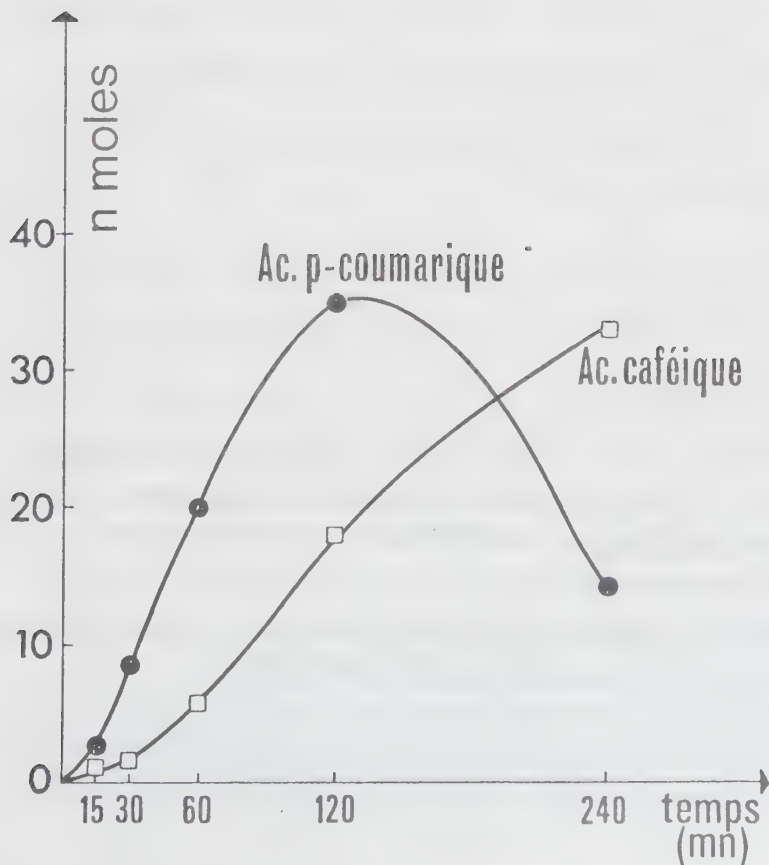


Figure 15 -

Formation séquentielle à partir de l'acide cinnamique des acides p-coumarique et caféique par des "microsomes" (1,25 mg de protéines par essai).

entraîneurs. On sépare puis on mesure la radioactivité des produits de la réaction comme il a été indiqué dans le cas de la O-méthyltransférase (photo 2).

2.- Résultats

Les figures 14 et 15 donnent les cinétiques de formation des acides de la série en C_6-C_3 à partir de la phénylalanine ou de l'acide cinnamique.

Les microsomes isolés des racines de Chêne sont capables d'effectuer la synthèse successive des acides cinnamique, p-coumarique et caféique (cette dernière réaction étant démontrée pour la première fois au niveau des microsomes : ALIBERT et al., 1972b) à partir de la phénylalanine comme seul substrat.

STAFFORD (1969, 1974) a suggéré l'existence d'un ou plusieurs complexes multienzymatiques liés aux membranes des organites cellulaires et menant des acides aminés aromatiques à l'acide férulique. La libération des intermédiaires dans le milieu ne milite pas en faveur d'un agrégat enzymatique au sens strict du terme (LUE et KAPLAN, 1970 ; GINSBURG et STADTMAN, 1970), elle suggère plutôt un arrangement spatial des protéines catalytiques (voir à ce sujet l'article de COLEMAN, 1973) permettant à l'un des produits formés d'être facilement utilisé comme substrat par l'enzyme suivante de la chaîne réactionnelle. AMRHEIN et ZENK (1971) ont d'ailleurs démontré que les activités PAL et cinnamate-4-hydroxylase détectées au niveau des microsomes étaient séparables par centrifugation en gradient de densité.

Sur un autre plan, il faut noter une conversion seulement partielle de l'acide cinnamique, issu de la phénylalanine, en ses dérivés hydroxylés (figure 14) ; en revanche, l'acide p-coumarique formé à partir de l'acide cinnamique (figure 15) est quantitativement transformé en acide caféique. Cette observation recoupe les données précédemment obtenues concernant l'efficacité respective de ces deux composés en tant que précurseurs de l'acide caféique (voir chapitre II) : au niveau de l'acide cinnamique, le flux carboné provenant de l'acide aminé pourrait encore subir différentes orientations métaboliques (dégradation, canalisation vers d'autres voies biosynthétiques que les acides de la série cinnamique, etc...) au sein même des "microsomes", cette redistribution serait rendue impossible dès la première hydroxylation.

Aucune indication n'a pu être obtenue sur le devenir des molécules d'acide cinnamique, synthétisées à partir de la phénylalanine et non utilisées dans la formation des acides hydroxylés.

On possède actuellement peu de données sur la nature des organites englobés sous le terme opérationnel de "microsomes" participant à la transformation de la phénylalanine en composés phénoliques. Un travail de PICKETT-HEAPS (1968) réalisé à l'aide des techniques d'autoradiographie indique cependant que plusieurs structures cellulaires, reticulum endoplasmique, appareil de golgi et microtubules, seraient des lieux de biosynthèse des unités aromatiques.

Il est certain que dans un proche avenir, cette technique, en permettant de travailler au niveau de la cellule intacte, apportera des compléments indispensables aux recherches sur la localisation intracellulaire des voies métaboliques.

V.- DISCUSSION GENERALE

A l'issue de ce travail sur le métabolisme des acides phénoliques et sa régulation chez le Chêne, il est possible d'établir un schéma général (figure 16) faisant apparaître les différentes voies de biosynthèse des acides phénols, ainsi que la régulation enzymatique et la compartimentation intracellulaire mises en évidence (ALIBERT et al., 1972 a).

A tout moment s'établirait dans la cellule un équilibre assuré par :

- la modulation du prélèvement de la phénylalanine du "pool" aminé général, résultat de la rétroinhibition de la PAL par les produits finaux des chaînes biosynthétiques qui en sont issues, et de son activation par l'acide gallique situé sur d'autres voies métaboliques,

- la répartition de l'acide cinnamique formé entre les deux séries phénoliques, fonction de l'activité relative des deux isoenzymes de la PAL,

- la canalisation du flux carboné issu des deux "pools" d'acide cinnamique vers les produits finaux, résultat de l'action combinée de la compartimentation intracellulaire et d'un arrangement spatial particulier des protéines catalytiques.

En raison de la localisation de chacune des voies biosynthétiques dans des organites cellulaires différents, un excès ou un déficit en l'un des acides phénols affecterait uniquement l'alimentation de sa chaîne métabolique et serait sans effet sur la production des unités de l'autre série.

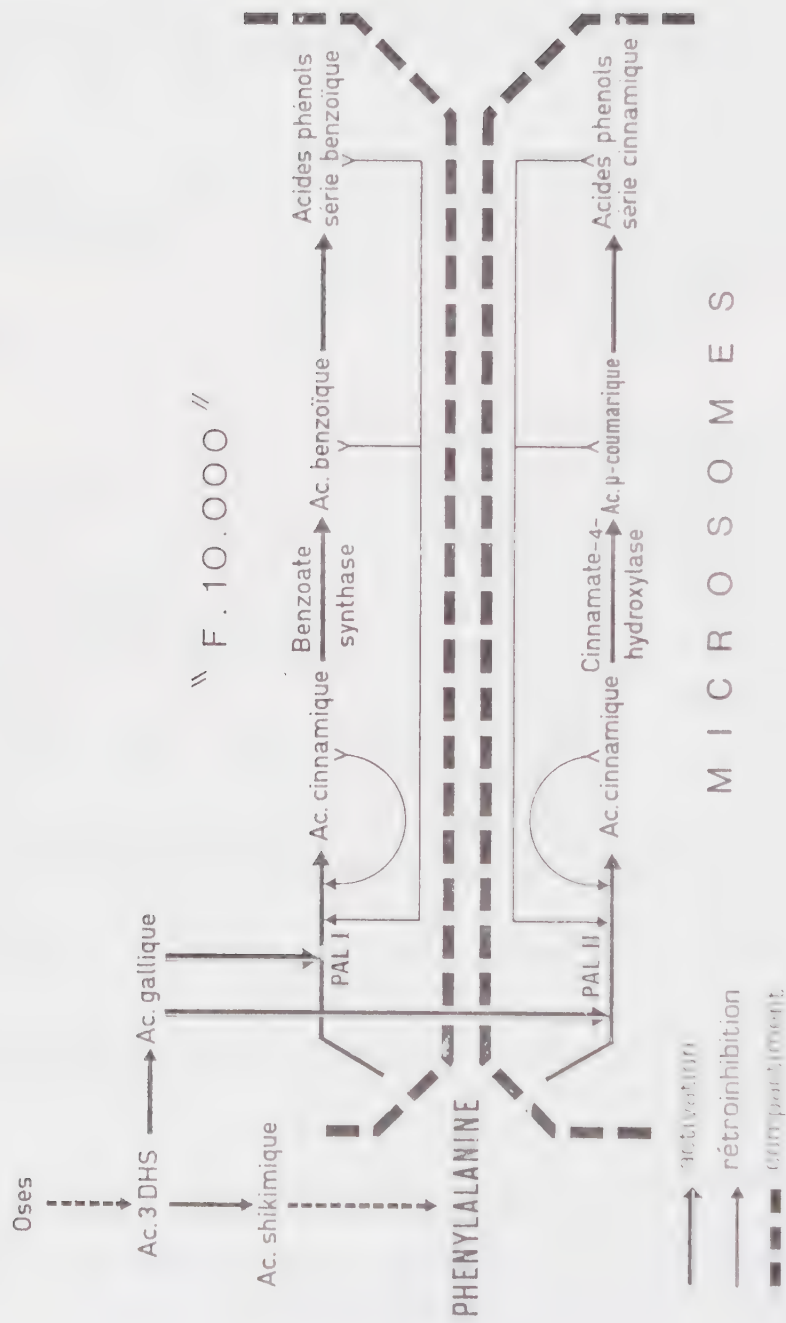


Figure 16 - Régulation de la biosynthèse des acides benzoïques et cinnamiques chez Quercus pedunculata

Il est donc mis en évidence ici un phénomène de régulation particulièrement fin qui, à ma connaissance constitue un exemple original. En effet, s'il est possible actuellement d'associer chaque isoenzyme de la malate déshydrogénase à une chaîne métabolique différente dans la cellule (TOLBERT, 1971 ; ROCHA et TING, 1971 ; ZSCHOCHÉ et TING, 1973), ce biocatalyseur ne représente cependant pas comme la PAL une enzyme clef dans une chaîne métabolique branchée. Il s'agit seulement d'un maillon dans différentes voies métaboliques utilisant les mêmes intermédiaires.

Malgré son efficacité, le système de régulation proposé à la suite de ce travail ne constitue vraisemblablement qu'un élément de l'ensemble des mécanismes mis en jeu in vivo par la cellule pour contrôler le métabolisme phénolique. Seule la formation et la régulation de la biosynthèse des acides cinnamiques et benzoïques ont été considérées ici. La diversité des substances aromatiques dérivant de ces unités simples (esters, hétérosides, flavonoïdes, coumarines, lignines, etc...), l'existence de séries métaboliques en C_6-C_2 (voir première partie), dérivant également de la phénylalanine (KINDL, 1969), la sensibilité extrême de la PAL aux variations des conditions du milieu extérieur (lumière, température, infection, etc...) laissent supposer une situation extrêmement complexe.

D'un point de vue général la PAL (LÖFFELHARDT et al., 1973) et la cinnamate-2-hydroxylase (GESTETNER et CONN, 1974) ont récemment été détectées au niveau des chloroplastes chez divers végétaux. Il semble donc que ces organites puissent constituer avec les "microsomes" et les "microbodies", un troisième compartiment où pourraient se dérouler les séquences métaboliques conduisant à d'autres structures polyphénoliques.

Dans tous les cas le précurseur initial serait l'acide cinnamique issu de trois activités PAL différentes.

On peut se demander si cette activité PAL relevée dans trois organites distincts, provient de la migration, dans ces structures, des protéines catalytiques synthétisées au niveau des ribosomes cytoplasmiques ou s'il faut envisager dans certains cas une synthèse in situ.

Quelles sont également les relations qui existent entre les différents compartiments cellulaires étudiés, au niveau des substrats et en particulier de l'approvisionnement en phénylalanine ?

Quel est le rôle des membranes dans ces échanges éventuels ?

Les différentes questions soulevées par cette étude dépassent largement (comme d'ailleurs les phénomènes de régulation mis en évidence) le cadre du simple métabolisme aromatique et se rattachent à des problèmes plus généraux concernant les mécanismes fondamentaux mis en jeu par les plantes pour établir, à tous les niveaux, les équilibres rigoureux caractéristiques de la vie.

CONCLUSIONS GENERALES

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail s'insère dans le cadre général de la connaissance du métabolisme des composés phénoliques chez les végétaux.

Volontairement limitées à un seul végétal (Quercus pedunculata) et aux unités phénoliques simples (acides benzoïques et cinnamiques) ces recherches visent à une compréhension approfondie des problèmes envisagés. Dans ce but, les études ont été menées à trois niveaux :

- analytique
- métabolique
- élucidation des phénomènes de régulation.

Au niveau analytique

Diverses techniques originales ont été mises au point. Elles concernent :

- l'extraction et la purification des acides phénoliques
- la séparation et l'identification (chromato-électrophorèse)
- le dosage (séparation et dosage automatisés, objet d'un brevet de la part de l'ANVAR).

Ces méthodologies ont été conçues pour l'étude d'un végétal dont la composition en substances phénoliques est très complexe, elles voient donc de ce fait leur domaine d'application largement assuré.

Chez le Chêne deux types essentiels de résultats ont été obtenus :

Identification et formes d'existence naturelles des acides phénols

• ces composés n'existent pratiquement pas à l'état libre mais sous forme de combinaisons solubles (esters et éthers-oxydes) ou insolubles.

• les acides benzoïques et cinnamiques coexistent chez le végétal mais les acides en C₆-C₁ hydroxylés sont largement prédominants.

• la fraction tannin est riche en acides phénoliques autres que les acides gallique et ellagique.

• de nombreux composés de nature indéterminée sont présents dans les extraits phénoliques de Chêne et l'identification de deux d'entre eux (les acides phtalique et homoprotocatéchique)

a permis d'entrevoir l'existence de structures aromatiques simples autres que les acides benzoïques et cinnamiques.

. Enfin, les formes insolubles des acides phénoliques ont fait l'objet d'une étude particulière et l'existence de complexes acides phénols - protéine a été établie.

Variations quantitatives des acides phénoliques au cours de la germination chez Quercus

Trois données principales ressortent de ces analyses :

. Les acides phénols sous forme esters ne sont présents chez le végétal qu'en faibles quantités, seul l'acide gallique est réellement abondant.

. La plupart des acides présentent un "état dynamique" au cours du phénomène morphogénétique étudié

. il est possible d'établir des corrélations entre les variations de deux d'entre eux (p-hydroxybenzoïque et gallique) et la morphogénèse : les rapports p-HB/G en faveur de l'acide monhydroxylé paraissent liés à l'apparition d'organes nouveaux, ceux favorables à l'acide gallique au contraire se rencontrent dans les états de faible activité métabolique et morphogénétique. Ces résultats sont en accord avec les idées générales qui se dégagent des nombreuses études effectuées sur le rôle régulateur des acides phénoliques.

Au niveau métabolique

En tenant compte des données précédemment obtenues au laboratoire, deux origines différentes des acides phénoliques semblent exister chez le Chêne :

- les acides protocatéchique et gallique dérivent directement de l'aromatisation des acides alicycliques (à partir de l'acide déshydroshikimique vraisemblablement)

- les autres composés des séries benzoïque et cinnamique proviennent de la phénylalanine par action initiale de la phénylalanine ammonia-lyase.

L'acide cinnamique est le précurseur des acides de la série en C_6-C_3 et les études cinétiques suggèrent l'existence de deux modes de formation de l'acide férulique :

- hydroxylations et méthylations successives de l'acide cinnamique selon la voie généralement admise, confirmée chez le Chêne par la mise en évidence des différentes enzymes catalysant ces

réactions (cinnamate-4-hydroxylase, 4-hydroxycinnamate-3-hydroxylase, caféoyl-O-méthyltransférase),

- méthoxylation directe de l'acide p-coumarique ; ce type de réaction déjà envisagée comme possible à diverses reprises n'a pas encore reçu de confirmation au niveau enzymatique.

Les acides en C_6-C_1 se forment à partir de leurs homologues de la série cinnamique soit directement (benzoïque, p-hydroxybenzoïque, vanillique) soit par hydroxylations de l'acide benzoïque (p-hydroxybenzoïque, salicylique, gentisique).

La mise en évidence pour la première fois de la "benzoate synthase", système enzymatique catalysant la réaction acide cinnamique $\longrightarrow$ acide benzoïque, apporte la preuve de l'existence in vivo de la transformation des acides cinnamiques en acide benzoïque chez les végétaux, suggérée pourtant dès 1952 par GEISSMAN et HINREINER.

Le mécanisme de la réaction n'a cependant pas pu être élucidé et deux possibilités subsistent :

- une dégradation du type acide gras, nécessitant une activation préalable par le coenzyme A,
- une oxydation directe libérant dans ce cas de l'acide oxalique.

Phénomène de régulation

Les études métaboliques on révélé la position stratégique occupée par l'acide cinnamique dans la formation des acides en C_6-C_1 et en C_6-C_3 . L'activité PAL qui lui donne naissance à partir de la phénylalanine est redevable de deux protéines catalytiques, spécifiquement sensibles aux acides cinnamiques et benzoïques.

La séparation des organites cellulaires a permis de montrer que :

- l'isoenzyme inhibée par les acides en C_6-C_3 est présente avec la cinnamate-4-hydroxylase dans les "microsomes",
- celle sensible aux acides benzoïques, en revanche, est localisée comme la "benzoate synthase" dans une fraction appelée "F 10 000" constituée principalement de mitochondries et de "microbodies".

Cette situation aboutit à une séparation spatiale des voies métaboliques dans des compartiments clos qui, en isolant dans la cellule deux "pools" d'acide cinnamique rend efficace la régulation par rétroinhibition des isoenzymes de la PAL.

Il est d'autre part probable qu'au niveau de chaque compar-
timent existe un agencement particulier des molécules catalytiques.
Une organisation moléculaire de ce type apporterait une efficacité
accrue des réactions enzymatiques par la création de concentrations
en substrat localement élevées. Cette efficacité est illustrée
par la formation in vitro des différents termes de la série cin-
namique à partir de la phénylalanine par une fraction microsomale
isolée.

En résumé, les éléments dominants de ce travail résident
essentiellement à trois niveaux :

- apport de méthodes d'études nouvelles des acides phénoliques
(extraction et purification de ces substances, identification et
dosage) qui devraient rendre plus aisées les recherches ultérieures
sur ces composés chez les végétaux,

- présentation d'une vue synthétique sur la formation des
acides phénols chez Quercus. En dehors de leur intérêt particulier,
les résultats suggèrent que pour le métabolisme phénolique (comme sans
doute pour d'autres constituants secondaires), on ne peut dégager
une unicité des voies de biosynthèse ; des variantes et des moda-
lités de formation différentes existent selon les espèces,

- démonstration de processus de contrôle complexes au niveau
de la chaîne de synthèse des acides phénols , données qui dépas-
sent le cadre du métabolisme aromatique et apportent quelques
éléments à la compréhension des processus de régulation mis en jeu
par les plantes pour moduler leur activité cellulaire.

x

x

x

Les recherches abordées dans ce travail s'inscrivent dans
le prolongement des études entreprises dans notre laboratoire
depuis quelques années sur les voies de biosynthèse des composés
phénoliques et leurs fonctions chez les végétaux.

Dans cette perspective, ma contribution personnelle ouvre la
voie à de nouveaux travaux qui se situeront dans les lignes direc-
trices de cette étude ou les dépasseront largement.

- Sur le plan analytique, la répartition des acides phénols

chez les végétaux et surtout leurs variations quantitatives (domaine encore peu connu), seront abordées.

- Sur le plan métabolique, des confirmations sont encore nécessaires au niveau des chaînes de synthèse étudiées (double origine possible de l'acide férulique, formation des acides benzoïques à partir des acides cinnamiques). Par ailleurs, les modalités de formation des esters et des hétérosides, l'intervention des unités phénoliques simples dans la synthèse des coumarines, des flavonoïdes et des lignines devront être rapidement envisagées.

Ces recherches seront menées de pair avec les études de régulation enzymatique et de localisation intracellulaire des biocatalyseurs impliqués dans ces diverses voies. Dans ce cadre, au-delà du site initial que constitue la PAL, d'autres sites privilégiés doivent permettre à la cellule d'orienter le flux métabolique vers les produits finaux. A cet effet, les formes activées des acides cinnamiques (thioesters du coenzyme A) semblent devoir représenter le point de départ de plusieurs chaînes métaboliques (formation des esters, flavonoïdes, lignines, etc...). Le mode de répartition des unités phénylpropènes vers ces différents produits finaux, par l'intermédiaire des acyl-CoA ligases, devra donc constituer un sujet à envisager en priorité.

S'il est probable que l'on retrouve au niveau de ces voies biosynthétiques des mécanismes de régulation comparables à ceux identifiés au cours de ce travail (mise en jeu d'isoenzymes, rétroinhibition ou activation spécifique de type allostérique, compartimentation cellulaire des voies métaboliques), d'autres possibilités comme la disponibilité des substrats et les transferts et échanges entre compartiments par exemple, peuvent également s'avérer essentiels.

De ce point de vue le travail envisagé sur le métabolisme aromatique, par les phénomènes fondamentaux qui seront abordés, doit apporter une contribution importante à la connaissance générale sur le fonctionnement du métabolisme chez les plantes.

A N N E X E

=====

SYNTHESE ENZYMATIQUE DE L'ACIDE p-COUMARIQUE U¹⁴C

L'acide p-coumarique marqué par le ¹⁴C n'étant pas commercialement disponible, j'ai été amené à réaliser sa synthèse par voie enzymatique selon les données fournies par NEISH (1961). Selon cet auteur les Graminées possèdent la propriété de désaminer la tyrosine en acide p-coumarique, réaction catalysée par la tyrosine ammonia-lyase (TAL) ; j'ai retenu comme source d'enzyme le Maïs (Zea mays, INRA, variété Dekalb 204).

- Les graines sont mises à germer sur vermiculite en présence de milieu nutritif de HOAGLAND-HARNON, en salle conditionnée pendant 8 jours. On prélève alors les parties aériennes et on réalise une poudre acétonique. Dans les conditions retenues, 40 g de matériel végétal frais permettent d'obtenir 2,8 g de poudre acétonique.

- Préparation des extraits enzymatiques : NEISH effectue la réaction enzymatique directement à partir des poudres acétoniques, cependant afin de simplifier les opérations ultérieures de purification de l'acide p-coumarique formé, j'ai préféré réaliser au préalable un extrait enzymatique selon le protocole général décrit précédemment.

Le culot protéique obtenu après précipitation par le sulfate d'ammonium est repris par du tampon phosphate mono-bi potassique M/10 pH 7,5 et dessalé par passage sur gel de Sephadex G 10 (Pharmacia Fine Chemical).

Toutes les opérations indiquées précédemment sont effectuées à une température comprise entre 0 et 4° C.

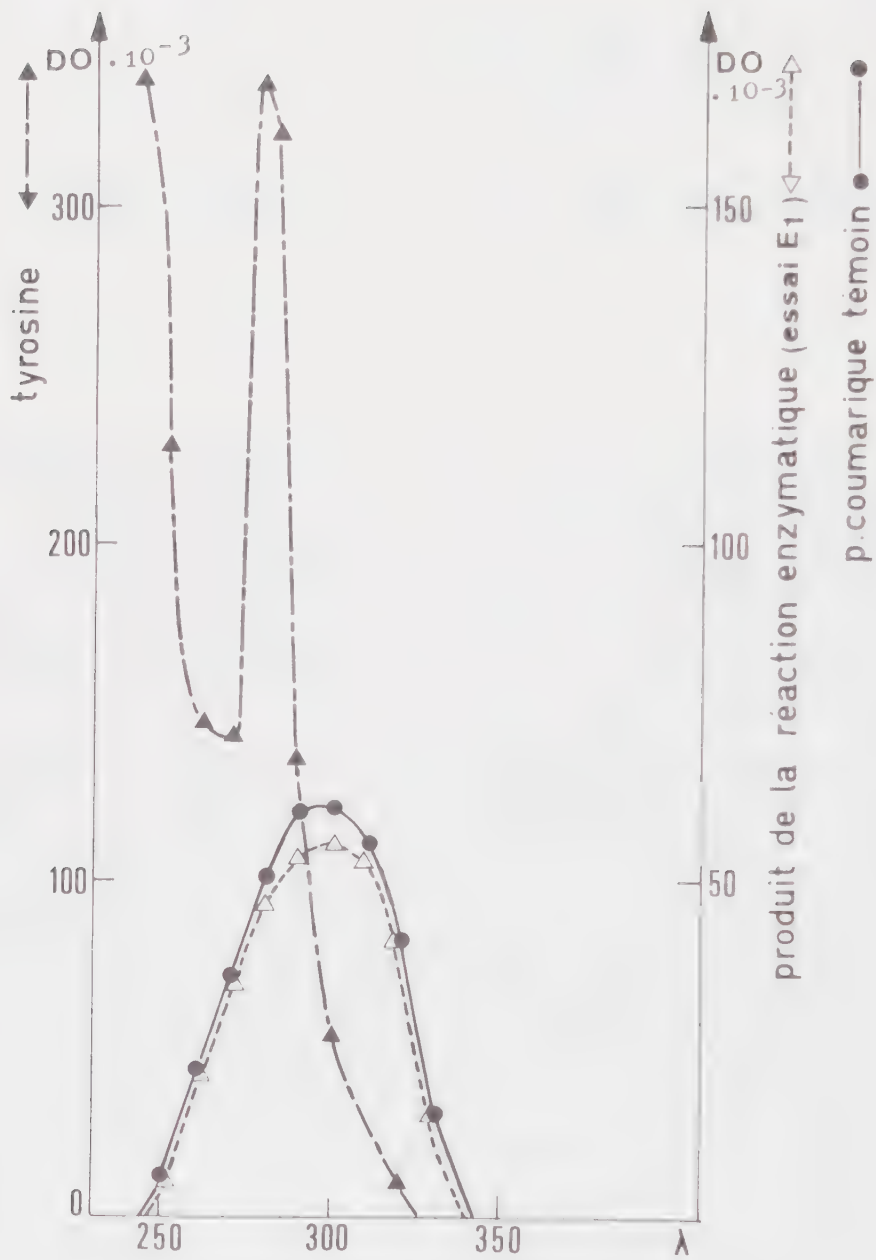


Figure 1 - Spectre UV dans l'éthanol à 95° G.L. de la tyrosine, de l'acide p-coumarique et du composé formé enzymatiquement au cours de la réaction E₁.

- La réaction enzymatique : le tableau suivant donne la composition des essais enzymatiques :

TABLEAU

Composants du milieu	T _e	T _s	E ₁	E ₂
Solution protéique (ml)	1	-	1	1
Tyrosine (micromoles)	-	0,5	0,5	-
Tyrosine U ¹⁴ C* (µCi)	-	-	-	15
Tampon Tris-HCl M/10 pH 7,7 q. s. p. 3 ml	+	+	+	+

* C.E.A. 190 mCi/mMoles

Après 4 heures à 40° C, on ajoute à chaque milieu 0,5 ml d'acide chlorhydrique 3 N pour arrêter la réaction puis on extrait l'acide p-coumarique éventuellement formé par 3 fois 10 ml d'éther éthylique. Les solutions éthérées réunies sont évaporées, le résidu repris par un minimum d'éthanol à 95° G.L. et déposé en bande de 5 cm sur papier Whatman N° 3. On laisse migrer les substances dans le solvant chloroforme - acide acétique - eau (2-1-1) (selon la technique indiquée dans la première partie) en présence de témoins commerciaux d'acide t-p-coumarique puis on laisse sécher 12 heures sous une hotte ventilée.

- Caractérisation du produit formé : elle est réalisée à partir des essais T_s T_e et E₁. L'observation en lumière UV à 254 et 366 nm, et la révélation d'une partie des bandes (1 cm de large) par la p-nitraniline, indiquent que seul E₁ contient une substance de nature phénolique qui migre au même niveau que l'acide p-coumarique témoin (rf = 0,53) et qui présente toutes les caractéristiques de ce composé (voir tableau V).

Les bandes de papier correspondant à la position de l'acide p-coumarique sont alors découpées et les substances qu'elles contiennent éluées par l'éthanol à 95° G.L. Le spectre UV réalisé alors sur ces solutions montre que seul E₁ possède une absorption caractéristique différente de celle de la tyrosine et exactement superposable au spectre d'une solution d'acide t-p-coumarique commercial (figure 1). L'extrait réalisé à partir des organes aériens de Maïs transforme bien enzymatiquement la tyrosine en acide p-coumarique.

- Pureté chimique et pureté radiochimique de l'acide p-coumarique synthétisé : l'acide p-coumarique formé au cours des réactions enzymatiques E₁ et E₂ est chromatographié sur papier



Figure 2 - Radiochromatogrammes, dans divers solvants, de l'acide p-coumarique ¹⁴C obtenu à partir de l'essai E₂.

BAE = butanol - acide acétique - eau (6-1-2 v/v)

BPE = butanol - pyridine - eau (14-3-3 v/v)

Et-NH₄OH-E = éthanol - ammoniacque - eau (80-5-15 v/v).

Whatman N° 1 selon la technique descendante, dans les solvants suivants :

butanol - acide acétique - eau (6-1-2 v/v)

butanol - pyridine - eau (14-3-3 v/v)

éthanol - ammoniacale - eau (80-5-15 v/v)

On n'observe pour E_1 en lumière UV et après révélation à la p-nitraniline qu'une seule tache possédant toutes les caractéristiques de l'acide p-coumarique (rf respectifs : 0,94, 0,80, 0,68). Le passage au lecteur de radioactivité (détecteur à scintillation en milieu semi-liquide, procédé ROUCAYROL, OBERHAUSEN, SCHÜSSLER SAIP modèle DMSL 1) des chromatogrammes obtenus pour les essais E_2 , ne montre la présence que d'un seul pic (figure 2) correspondant à la radioactivité de l'acide p-coumarique synthétisé. L'acide p-coumarique formé est donc chimiquement et radiochimiquement pur.

- Rendement de la réaction enzymatique et activité spécifique :
dans les conditions retenues, le rendement est sensiblement de 22 %. L'activité spécifique de l'acide p-coumarique formé est du même ordre de grandeur que celui de la tyrosine utilisée comme substrat soit 190 mCi/millimoles.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS J.M. et CAPECCHI M.R., 1966 - N-formylmethionyl-sRNA as the initiator of protein synthesis. Biochemistry, 55, 147-155.
- AHMED S.I. et SWAIN T., 1970 - The effect of light on the activity of enzymes of the aromatic pathways in peas and mung beans. Phytochemistry, 9, 2287-2290.
- ALIBERT G., 1968 - Les acides phénoliques chez Quercus pedunculata Ehrh. Thèse Doct. Spécialité, Toulouse.
- ALIBERT G., 1973 a - Séparation et dosage automatisés des acides phénoliques végétaux par chromatographie sur colonne de Polyclar et spectrophotométrie dans l'ultra violet. J. of Chromatogr., 80, 173-185.
- ALIBERT G., 1973 b - Séparation et dosage automatisés des acides phénoliques. Compte rendu de l'Assemblée générale Annuelle du groupe POLYPHENOLS, Pont de la Morge, Valais Suisse, 4.
- ALIBERT G. et RANJEVA R., 1971 - Recherches sur les enzymes catalysant la biosynthèse des acides phénoliques chez Quercus pedunculata (Ehrh.). I. Formation des premiers termes des séries cinnamique et benzoïque. FEBS Letters, 19, 11-14.
- ALIBERT G., MARIGO G. et BOUDET A., 1968 - Recherches sur la biosynthèse des composés aromatiques chez les végétaux supérieurs : sur la présence d'acides phénoliques dans une fraction protéique isolée des feuilles de Quercus pedunculata Ehrh.. C. R. Acad. Sci., 267, 2144-2146.
- ALIBERT G., MARIGO G. et BOUDET A., 1969 - Recherches sur la biosynthèse des composés aromatiques chez les végétaux supérieurs. Identification des acides phénoliques de Quercus pedunculata Ehrh.. Physiol. vég., 7, 57-68.
- ALIBERT G., RANJEVA R. et BOUDET A., 1972 a - Recherches sur les enzymes catalysant la formation des acides phénoliques. Chez Quercus pedunculata (Ehrh.). II. Localisation intracellulaire de la phénylalanine ammoniacque-lyase, de la cinnamate 4-hydroxylase et de la "benzoate synthase". Biochim. Biophys. Acta, 279, 282-289.

- ALIBERT G., RANJEVA R. et BOUDET A., 1972 b - Recherches sur les enzymes catalysant la biosynthèse des acides phénoliques chez Quercus pedunculata. III. Formation séquentielle à partir de la phénylalanine, des acides cinnamique, p-coumarique et caféique, par des organites cellulaires isolés. Physiol. Plant., 27, 240-243.
- AMRHEIN N., et ZENK M.H., 1969 - Das auftreten des "NIH-shifts" bei der in vivo und in vitro bildung hydroxylierter zimtsäure-derivate in buchweizenhypokotylen (Fagopyrum esculentum). Phytochemistry, 8, 107-113.
- AMRHEIN N. et ZENK M.H., 1971 - Untersuchungen zur Rolle der phenylalanin-ammonium-lyase (PAL) bei der regulation der flavonoidsynthese im Buchweizen (Fagopyrum esculentum Moench.) Z. Pflanzenphysiol., 64, 145-168.
- ANDERSON J.W. et ROWAN K.S., 1967 - Extraction of soluble leaf enzymes with thiols and other reducing agents. Phytochemistry, 6, 1047-1056.
- ATTRIDGE T.H. et SMITH H., 1973 - Light-mediated changes in the properties of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in pea buds. Plant Science Letters, 1, 247-252.
- BAHL J., GUILLOT-SALOMON T. et DOUCE R., 1970 - Synthèse enzymatique du cytidine diphosphate di-glycéride dans les végétaux supérieurs. Physiol. vég., 8, 55-74.
- BARTHE J.P., 1972 - Etude des propriétés de la phénoloxydase de Quercus pedunculata (Ehrh). Thèse Doct. Spécialité, Toulouse.
- BASTIN M., 1966 a - Root initiation, auxin level and biosynthesis of phenolic compounds. Photochemistry and Photobiology, 5, 423-429.
- BASTIN M., 1966 b - Métabolisme auxinique et rhizogénèse. III. Interactions entre l'auxine et quelques substances phénoliques présentes dans les boutures d'Impatiens balsamina L., In. Les phytohormones et l'organogénèse, Congr. Colloq. Univ. Liège, 123-140.
- BASU R.N., BOSE T.K., ROY B.N. et MUKHOPADHAYA A., 1969 - Auxin synergists in rooting of cuttings. Physiol. Plant., 22, 649-652.
- BATE-SMITH E.C., 1948 - Paper chromatography of anthocyanins and related substances in petal extracts. Nature, 101, 835-838.

- BATE -SMITH E.C., 1956 - The commoner phenolic constituents of plants and their systematic distribution. Sci. Proc. Roy Dublin Soc., 27, 165-176.
- BEMILLER J.N., RIMSAY R.L. et PAPPELIS A.J., 1967 - Extraction and purification of phenolic acids from corn stalk tissue. Trans Illinois State Acad. Sci., 60, 68-71.
- BENVENISTE I. et DURST F., 1974 - Mise en évidence dans les tissus de tubercule de Topinambour (Helianthus tuberosus L., variété blanc commun) d'une enzyme à cytochrome P-450, l'acide trans-cinnamique 4-hydroxylase (=CAH). C. R. Acad. Sci., 278, 1487-1490.
- BILLEK G. et SCHMOOK F.P., 1966 - Biosynthese der Benzoessäuren. Osterreichische Chemiker-Zeitung., 67, 401-409.
- BILLEK G., et SCHMOOK F.P., 1967 - Zur Biosynthese der Gentisinsäure. Mh. Chem., 98, 1651-1663.
- BLAKLEY E.R., 1966 - Gas chromatography of phenolic acids. An. Biochem., 15, 350-354.
- BOHM B.A. et TOWERS G.H.N., 1962 - A study of phenolic compounds in Impatiens. Canad. J. Bot., 40, 677-683.
- BONNER J. et GALSTON A.W., 1944 - Bot. Gaz., 106, 185-188 cité par KEFELI V.I. et KADYROV C.S., 1971.
- BONNER W.D. Jr., 1967 - A general method for the preparation of plant mitochondria. In. Methods in Enzymology, S.P. COLOWICK et N.O. KAPLAN, éd., Vol. X, Academic Press, New York, p. 126.
- BOUDET A., 1965 - Sur quelques aspects de l'inhibition des enzymes par les tannins des feuilles de Quercus sessilis Ehrh. Thèse Doct. Spécialité, Toulouse.
- BOUDET A.M., 1972 - Les acides quinique et shikimique et leur métabolisme chez les végétaux supérieurs. Thèse Doct. Sci. nat., Toulouse.
- BOUDET A., MARIGO G., et ALIBERT G., 1967 a - Recherches sur la biosynthèse et le métabolisme des composés aromatiques chez les végétaux supérieurs. Variations des teneurs en acides quinique et shikimique dans les feuilles de Quercus pedunculata Ehrh. au cours d'une année de végétation. C. R. Acad. Sci., 265, 209-212.

- BOUDET A., RANJEVA R. et GADAL P., 1971 - Propriétés allostériques spécifiques des deux isoenzymes de la phénylalanine ammoniacale lyase chez Quercus pedunculata. Phytochemistry, 10, 997-1005.
- BOUDET A., GADAL P., ALIBERT G. et MARIGO G., 1967 b - Recherches sur la biosynthèse et le métabolisme des composés aromatiques chez les végétaux supérieurs. Mise en évidence des précurseurs alicycliques chez Quercus pedunculata Ehrh. : acides quinique, 5-déshydroquinique, 5-déshydroshikimique et shikimique. C. R. Acad. Sci., 265, 119-122.
- BOUILLENNE-WALRAND M., 1966 - Auxines et gibberellines dans l'induction florale. In. Les phytohormones et l'organogénèse. Congr. Colloque Univ. Liège, 301-321.
- BRAY G.A., 1960 - A simple efficient liquide scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. Anal. Biochem., 1, 279-285.
- BROWN S.A., 1966 - Lignins. Ann. Rev. Plant physiol., 17, 223-244.
- BRUNEL A., 1948 - Traité pratique de Chimie végétale. G. Frère éd., Tourcoing, Vol. I, p. 317.
- BÜCHE T. et SANDERMANN H. Jr., 1973 - Lipid dependence of plant microsomal cinnamic acid 4-hydroxylase. Arch. Biochem. Biophys., 158, 445-447.
- CAMM E.L. et TOWERS G.H.N., 1973 a - Phenylalanine ammonia-lyase Phytochemistry, 12, 961-973.
- CAMM E.L. et TOWERS G.H.N., 1973 b - Effect of ageing on enzymes of phenylpropanoid metabolism in Solanum tuberosum discs. Phytochemistry, 12, 1575-1580.
- CARLES J., 1968 - Le dosage automatique des acides organiques par potentiométrie. Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 1341-1345.
- CATROUX G. et BLACHERE H., 1966 - Séparation des acides phénoliques par chromatographie en phase gazeuse de leurs dérivés triméthylsilylés. C. R. Acad. Sci., 262, 1345-1347.
- COHEN G.N., 1965 - Regulation of enzyme activity in microorganisms Ann. Rev. Microbiol., 19, 105-126.

- COLEMAN R., 1973 - Membrane-bound enzymes and membrane ultrastructure. Biochim. Biophys. Acta, 300, 1-30.
- COLONNA J.P. et BOUDET A., 1971 - Etude cinétique de l'incorporation des acides ^{14}C quinique et ^{14}C cinnamique dans la molécule d'acide chlorogénique des tissus foliaires du Caféier (*Coffea Dewevrei* de Wild et Durand, race C. Excelsa A. Chev.). C. R. Acad. Sci., 272, 952-955.
- CÔME D., 1970 - Les obstacles à la germination. Monographie de Physiologie Végétale. Masson & C^o éd., Paris.
- CONN E.E., 1964 - Enzymology of phenolic biosynthesis. In. Biochemistry of phenolic compounds, J.B. HARBORNE éd., Academic Press London and New York, p. 399-435.
- CONN E.E. et SWAIN T., 1961 - Biosynthesis of gallic acid in higher plants. Chem. and Ind., 18, 592-593.
- CORNER J.J. et HARBORNE J.B., 1960 - Cinnamic acid derivatives of potato berries. Chem. and Ind., 3, p. 76.
- DALY J.W., JERINA D.M. et WITKOP B., 1972 - Arene oxides and the NIH shift : the metabolism, toxicity and carcinogenicity of aromatic compounds. Experientia, 28, 1129-1264.
- DAS V.S.R., RAO J.V.S. et RAO K.N., 1967 - Levels of phenolic acids during fruit growth in Citrullus colocynthis. Z. Pflanzenphysiol., 56, 466-468.
- DEDONDER A. et VAN SUMERE C.F., 1971 - The effect of phenolics and related compounds on the growth and the respiration of Chlorella vulgaris. Z. Pflanzenphysiol., 65, 70-80.
- DEWICK P.M. et HASLAM E., 1968 - Observations on the biosynthesis of gallic acid and caffeic acid. Chemical communications, 12, 673-675.
- DIXON M., 1953 - Nomogram for ammonium sulfate solutions. In. Methods in Enzymology, S.P. COLOWICK et N.O. KAPLAN, éd., Vol. I, Academic Press, New York, 76-77.
- DOUCE R., GUILLOT-SALOMON T., LANCE C. et SIGNOL M., 1968 - Etude comparée de la composition en phospholipides de mitochondries et de chloroplastes isolés de quelques tissus végétaux. Bull. Soc. Fr. Physiol. vég., 14, 351-373.

DURRUM E.L., 1951 - Paper ionophoresis. Science, 113, 66-68.

EBEL J. et GRISEBACH H., 1973 - Reduction of cinnamic acids to cinnamoyl alcohols with an enzyme preparation from cell suspension cultures of soybean (*Glycine max*). FEBS Letters, 30, 141-143.

EL BASYOUNI S. et TOWERS G.H.N., 1964 - The phenolic acids in wheat. I. Changes during growth and development. Canad. J. Biochem., 42, 203-210.

EL BASYOUNI S.Z. et NEISH A.C., 1966 - Occurrence of metabolically active bound forms of cinnamic acid and its phenolic derivatives in acetone powders of wheat and barley plants. Phytochemistry, 5, 683-691.

EL BASYOUNI S.Z., NEISH A.C. et TOWERS G.H.N., 1964 a - The phenolic acids in wheat. III. Insoluble derivatives of phenolic cinnamic acids as natural intermediates in lignin biosynthesis. Phytochemistry, 3, 627-639.

EL BASYOUNI S.Z., CHEN D., IBRAHIM R.K., NEISH A.C. et TOWERS G.H.N. 1964 b - The biosynthesis of hydroxybenzoic acids in higher plants. Phytochemistry, 3, 485-492.

EMBS R.J. et MARKAKIS P., 1966 - Enzymatic conversion of p-coumaric acid to caffeic acid. Michigan Quarterly Bulletin, 49, 51-54.

ENGELSMA G., 1967 a - Photoinduction of phenylalanine deaminase in Gherkin seedlings. I. Effect of blue light. Planta, 75, 207-219.

ENGELSMA G., 1967 b - Photoinduction of phenylalanine deaminase in Gherkin seedlings. II. Effect of red and far-red light. Planta, 77, 49-57.

ENGELSMA G., 1968 a - Photoinduction of phenylalanine deaminase in Gherkin seedlings. III. Effects of excision and irradiation on enzyme development in hypocotyl segments. Planta, 82, 355-368.

ENGELSMA G., 1968 b - The influence of light of different spectral regions on the synthesis of phenolic compounds in Gherkin seedlings in relation to morphogenesis. V. The temperature dependence. Acta Bot. Neerl., 17, 499-505.

- ENGELSMA G., 1972 - A possible role of divalent manganese ions in the photoinduction of phenylalanine ammonia-lyase. Plant Physiol., 50, 599-602.
- FAUSCH H., KUNDIG W. et NEUKOM H., 1963 - Ferulic acid as a component of a glycoprotein from wheat flour. Nature, 199, p. 287.
- FEENY P.P. et BOSTOCK H., 1968 - Seasonal changes in the tannin content of oak leaves. Phytochemistry, 7, 871-880.
- FINKLE B.J. et NELSON R.F., 1963 - Enzyme reactions with phenolic compounds : a meta-O-methyltransferase in plants. Biochim. Biophys. Acta, 78, 747-749.
- FINKLE B.J. et MASHRI M.S., 1964 - Methylation of polyhydroxy aromatic compounds by pampas grass O-methyl transferase. Biochim. Biophys. Acta, 85, 167-169.
- FLEURIET A. et MACHEIX J.J., 1972 - Separation et dosage par chromatographie en phase gazeuse de l'acide chlorogénique et des catéchines des fruits. J. of Chromatogr., 74, 339-345.
- FRITIG B., HIRTH L. et OURISSON G., 1970 - Biosynthesis of the coumarins : scopoletin formation in tobacco tissue cultures. Phytochemistry, 9, 1963-1975.
- GADAL P., 1970 - Sur le métabolisme du Chêne et de ses zoocécidies. Etude particulière de la biosynthèse des acides aminés aromatiques. Thèse Doct. sci. nat., Toulouse.
- GAMBORG O.L., 1967 - Aromatic metabolism in plants. IV. The interconversion of shikimic acid and quinic acid by enzymes from plant cell cultures. Phytochemistry, 6, 1067-1073.
- GEISSMAN T.A. et HINREINER E., 1952 - Theories of the biogenesis of flavonoid compound. Bot. Rev., 18, 77-164.
- GEISSMAN T.A. et SWAIN T., 1957 - Biosynthesis of flavonoid compounds in higher plants. Chem. and Ind., 28, 968-984.
- GESTETNER B. et CONN E.E., 1974 - The 2-hydroxylation of trans-cinnamic acid by chloroplasts from Melilotus alba Desr. Arch. Biochem. Biophys., 163, 617-624.
- GESTO M.D.V., VÁZQUEZ A., MÉNDEZ J., VIEITEZ E. et SEOANE E., 1967 - Growth substances isolated from woody cuttings of Quercus robur L. and Juglans regia L., Phytochemistry, 6, 1687-1693.

- GINSBURG A. et STADTMAN E.R., 1970 - Multienzyme systems. Annu. Rev. Biochem., 39, 429-472.
- GLASS A.D.M., 1973 - Influence of phenolic acids on ion uptake. I. Inhibition of phosphate uptake. Plant Physiol., 51, 1037-1041.
- GORTNER W.A. et KENT M.J., 1958 - Coenzyme requirement and enzyme inhibitors of pineapple indoleacetic acid oxydase. J. Biol. Chem., 233, 731-735.
- GRISEBACH H. et VOLLMER K.O., 1963 - The biosynthesis of methyl salicylate in Gaultheria procumbens. Z. Naturforsch., 18_b 753-756.
- GROSS G.G. et ZENK M.H., 1966 - Darstellung und Eigenschaften von Coenzyme A- Thiolester substituierten Zimtsäuren. Z. Naturforsch., 21_b, 683-680.
- GROSS G.G., STÖCKIGT J., MANSELL R.L., et ZENK M.H., 1973 - Three novel enzymes involved in the reduction of ferulic acid. to coniferyl alcohol in higher plants : ferulate:CoA ligase, feruloyl-CoA reductase acid coniferyl alcohol oxidoreductase. FEBS Letters, 31, 283-286.
- HACHTEL W., 1972 - The influence of the plasmotype on the regulation of the activity of L-phenylalanine ammonia-lyase (studies on Oenothera forms of the section Raimannia). Planta, 102, 247-260.
- HASHIZUME T., YAMAGAMI T. et SASAKI Y., 1967 - Constituents of cane molasses. II. Separation and identification of phenolic compounds. Agr. Biol. Chem., 31, 324-329.
- HAHLBROCK K., EBEL J., ORTMANN R., SUTTER A., WELLMANN E. et GRISEBACH H., 1971 - Regulation of enzyme activities related to the biosynthesis of flavone glycosides in cell suspension cultures of parsley (Petroselinum hortense). Biochim. Biophys. Acta, 244, 7-15.
- HANSON K.R. et ZUCKER M., 1963 - The biosynthesis of chlorogenic acid and related conjugates of the hydroxycinnamic acids. Chromatographic separation and characterization. J. Biol. Chem., 238, 1105-1115.
- HARBORNE J.B. et CORNER J.J., 1960 - The metabolism of cinnamic acids and coumarins in higher plants. Chem. and Ind., 76, p. 53.

- HARBORNE J.B. et CORNER J.J., 1961 - Plant polyphenols. IV. Hydroxycinnamic acid -sugar derivatives. Biochem. J., 81, 242-250.
- HARBORNE J.B. et SIMMONDS N.W., 1964 - The natural distribution of the phenolic aglycones. In. Biochemistry of phenolic compounds, J.B. HARBORNE éd., Academic Press, London and New York, p. 77-127.
- HAREL E., MAYER A.M. et SHAIN Y., 1964 - Catechol-oxydases from apples their properties, subcellular location and inhibition. Physiol. plant., 17, 921-930.
- HAREL E., MAYER A.M. et SHAIN Y., 1965 - Purification and multiplicity of catechol oxydase from apple chloroplasts. Phytochemistry, 4, 783-790.
- HATHWAY D.E., 1958 - Oak bark tannins. Biochem J., 40, 34-42.
- HAVIR E.A., REID P.D. et MARSH H.V., 1971 - L-phenylalanine ammonia-lyase (Maize). Evidence for a common catalytic site for L-phenylalanine and L-tyrosine. Plant Physiol., 48, 130-136.
- HESS D., 1964 - Methionin als methylgruppendonator für Einetsäuren und anthocyane. Z. Naturforsch., 19, 148-150.
- HILLIS W.E. et URBACH G., 1959 - The reaction of (+)-catechin with formaldehyde. J. Appl. Chem., 9, 474-482.
- HÖRHAMMER L., 1963 - Polyamide chromatography of flavonoids and anthraquinones. In. Methods in polyphenol chemistry. J.B. PRIDHAM éd., Pergamon Press Oxford, London, Edinburgh, New York, Paris, Frankfurt. pp. 89-95.
- HRAZIDINA C., 1970 - Column chromatographic isolation of the anthocyanidin-3,5-diglucosides from grapes. J. Agr. Food. Chem., 18, 243-245.
- HUANG A.H.C. et BEEVERS H., 1971 - Isolation of microbodies from plant tissues. Plant Physiol., 48, 637-641.
- HUANG A.H.C. et BEEVERS H., 1973 - Localization of enzymes within microbodies. J. Cell. Biol., 58, 379-389.

- HUAULT C., 1970 - Contrôle de l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) par le phytochrome dans les plantules de radis et de moutarde. Physiol. vég., 8, p. 532.
- HULME A.C. et WOOLTORTON L.S.C., 1958 - Determination and isolation of the non-volatile acids of pome fruits and a study of acid changes in apples during storage. J. Sci. Food. Agric. 9, 150-158.
- HULME A.C., JONES J.D. et WOOLTORTON L.S.C., 1964 - Mitochondrial preparations from the fruit of the apple. I. Preparation and general activity. Phytochemistry, 3, 173-188.
- IBRAHIM R.K., 1964 - Biosynthesis of hydroxybenzoic acids in higher plants. Flora, 154, 481-489.
- IBRAHIM R.K. et TOWERS G.H.N., 1959 - Conversion of salicylic acid to gentisic acid and O-pyrocatechuic acid, all labelled with ^{14}C , in plants. Nature, 184, 1803-1804.
- IBRAHIM R.K. et TOWERS G.H.N., 1960 - The identification by chromatography, of plant phenolic acids. Arch. Biochem. Biophys., 87, 125-128.
- ISHIKAWA H., SCHUBERT W.J. et NORD F.F., 1963 - Investigations on lignins and lignification. XXX. Enzymic degradation of guaiacylglycerol and related compounds by white-rot fungi. Biochem. Z., 338, 153-163.
- JACOBSON J.S., 1961 - The brown pigments of autolysed tobacco leaves. I. Isolation and characterisation. Arch. Biochem. Biophys., 93, 580-590.
- JENSEN R.A., 1969 - Metabolic interlock. Regulatory interactions exerted between biochemical pathways. J. Biol. Chem., 244, 2816-2823.
- JONES J.D., HULME A.C. et WOOLTORTON L.S.C., 1964 - Mitochondrial preparations from the fruit of the apple. II. Oxidative phosphorylation. Phytochemistry, 3, 201-212.
- KARLSEN J. et SVENDSEN A.B., 1965 - Gaschromatographie einiger natürlich Vorkommender aromatischer Carbonsäuren und phenolcarbonsäuren. Saetrykk av Meddelelser fra Norsk Farmaceutisk Selskap, 6, 91-98.

- KEFELI V.I. et KADYROV C.S., 1971 - Natural growth inhibitors their chemical and physiological properties. Ann. Rev. Plant Physiol., 22, 185-196.
- KESSLER R.B., 1967 - Rapid quantitative anion-exchange chromatography of carbohydrates. Anal. Chem., 39, 1416-1422.
- KHANNA S.K., VISWANATHAN P.N., KRISHNAN P.S. et SANWAL G.G., 1968 - Extraction of total phenolics in the presence of reducing agents. Phytochemistry, 7, 1513-1517.
- KICKHÖFEN B. et WESTPHAL O., 1952 - A simple combination of paper electrophoresis and paper chromatography. Z. Naturforsch., 7b, 659-660.
- KINDL H., 1969 - Biosynthesis and metabolism of hydroxyphenylacetic acids in higher plants. European J. Biochem., 7, 340-347.
- KINDL H. et BILLEK G., 1962 - Oesterr. Chem.- Ztg., 63, p. 290
Cit  par ZENK H., 1966.
- KINDL H. et RUIS M., 1971 - Metabolism of aromatic amino acids in glyoxysomes. Phytochemistry, 10, 2633-2636.
- KINDL H., SCHOLDA R. et HOFFMANN-OSTENHOF O., 1967 - Untersuchungen  ber die biosynthese der cyclite. XV. Zur bildung von L-(+) Quercit in Quercus Arten. Phytochemistry, 6, 237-244.
- KLEINSMITH L.J., 1972 - Molecular mechanisms for the regulation of cell function. BioScience, 22, 343-348.
- KOSHLAND D.E. Jr., NEMETHY G. et FILMER D., 1966 - Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. Biochemistry, 5, 365-385.
- KOUASSI P., 1973 - La phénylalanine ammoniacque-lyase (E.C. 4.3.1.5): Recherches de formes multiples chez différents végétaux. Rapport de D.E.A, Toulouse.
- KOUKOL J. et CONN E.E., 1961 - The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of Hordeum vulgare. J. Biol. Chem., 236, 2692-2698.
- K VES E., SIROKMAN F. et MILASSIN M., 1972 - Connection between the growth regulating action of plant phenolic compounds and the protein synthesis. Z. Pflanzenphysiol., 67, 370-372.

- KRAMLING T.E. et SINGLETON V.L., 1969 - An estimate of the non-flavonoid phenols in wines. Am. J. Enol. Viticult., 20, 86-92.
- KREUZALER F. et HAHLBROCK K., 1972 - Enzymatic synthesis of aromatic compounds in higher plants : formation of naringenin (5,7,4'-trihydroxyflavanone) from p-coumaroyl Coenzyme A and malonyl Coenzyme A. FEBS Letters, 28, 69-72.
- LANG C.A., 1958 - Simple microdetermination of Kjeldahl nitrogen in biological materials. Anal. Chem., 30, 1692-1694.
- LEVY C.C. et ZUCKER M., 1960 - Cinnamyl and p-coumaryl esters as intermediates in the biosynthesis of chlorogenic acid. J. Biol. Chem., 235, 2418-2425.
- LOCHE J., 1966 - Contribution à l'étude des polyphénols de la plante de Tabac. Thèse Doct. Ingénieur, Toulouse.
- LÖFFELHARDT W., LUDWIG B. et KINDL H., 1973 - Thylakoid-gebundene L-phenylalanin-Ammoniak-Lyase. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 354, 1006-1012.
- LOOMIS W.D. et BATTAILE J., 1966 - Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. Phytochemistry, 5, 423-438.
- LUCK H., 1965 - Catalase. In. Methods of enzymatic analysis. H.U. BERGMEYER éd., Academic Press, New York, p. 886.
- LUE P.F. et KAPLAN J.G., 1970 - Metabolic compartmentation at the molecular level : the function of a multienzyme aggregate in the pyrimidine pathway of yeast. Biochim. Biophys. Acta, 220, 365-372.
- LYNEN F., 1955 - Lipid metabolism. An. Rev. Biochem., 24, 653-688.
- Mac CALLA D.R. et NEISH A.C., 1959 a - Metabolism of phenylpropanoid compounds in Salvia. I. Biosynthesis of phenylalanine and tyrosine. Canad. J. Biochem. Physiol., 37, 531-536.
- Mac CALLA D.R. et NEISH A.C., 1959 b - Metabolism of phenylpropanoid compounds in Salvia. II. Biosynthesis of phenolic cinnamic acids. Canad. J. Biochem. Physiol., 37, 537-547.
- Mac CLURE J.W., 1974 - Phytochrome control of oscillating levels of phenylalanine ammonia-lyase in Hordeum vulgare shoots. Phytochemistry, 13, 1065-1069.

- Mac FARLANE W.D., 1961 - Determination of anthocyanogens. J. Inst. Brew., 67, 502-506.
- MACHEIX J.J., 1974 - Evolution de la teneur du fruit de Pirus malus L. en esters des acides p-coumarique et caféique au cours de la croissance. Physiol. vég., 12, 25-33.
- MARCUS A., 1971 - Enzyme induction in plants. Annu. Rev. Plant Physiol., 22, 313-336.
- MARIGO G., 1970 - Contribution à l'étude de la biosynthèse des acides phénoliques chez Quercus pedunculata Ehrh. Thèse Doct. Spécialité, Toulouse.
- MARIGO G., 1971 - Recherches sur la biosynthèse des composés aromatiques chez les végétaux supérieurs : mise en évidence d'une combinaison entre l'acide phtalique et l'acide quinique chez Quercus pedunculata Ehrh. Origine métabolique de l'acide phtalique. C. R. Acad. Sci., 273, 1707-1709.
- MARIGO G., 1973 - Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux. Analisis, 2, 106-110.
- MARIGO G. et ALIBERT G., 1969 - Recherches sur la biosynthèse des composés aromatiques chez les végétaux supérieurs. Mise en évidence des acides α -résorcylique, homoprotocatéchique et phtalique dans les feuilles de Quercus pedunculata Ehrh. C. R. Acad. Sci., 269, 1963-1965.
- MARIGO G., ALIBERT G. et BOUDET A., 1969 - Recherches sur la biosynthèse des composés aromatiques chez les végétaux supérieurs : sur l'origine des acides protocatéchique et gallique chez Quercus pedunculata Ehrh. C. R. Acad. Sci., 269, 1852-1854.
- MARINI-BETTOLO G.B. et LEDERER M., 1954 - Paper electrophoresis of Strychnos alkaloids. Nature, 174, 133-134.
- MASON H.S., 1957 - Mechanisms of oxygen metabolism. In. Advances in Enzymology, F.F. NORD éd., Interscience publishers Inc. New York, London, Vol. XIX, 79-233.
- MAYER A.M. et POLJAKOFF-MAYBER A., 1963 - The germination of seeds. International series of monographs on pure and applied biology. P.F. WAREING and A.W. GALSTON éd., Pergamon Press Oxford, London, New York and Paris.
- MENDEZ J. et STEVENSON F.J., 1966 - Detection of phenolic carboxylic acids by gas-liquid chromatography. J. gas Chromatogr., 4, 483-485.

- MICHNIEWICZ M. et ROZEJ B., 1974 - Stimulation of transpiration rate in bean plants by ferulic acid. Naturwissenschaften, 61, p. 33.
- MINAMIKAWA T. et URITANI I., 1965 a - Phenylalanine ammonia-lyase in sliced sweet potato roots. J. Biochem., 57, 678-688.
- MINAMIKAWA T. et URITANI I., 1965 b - Phenylalanine ammonia-lyase in sweet potato roots. Inhibition by phenyl propanoids. J. Biochem., 58, 53-59.
- MONOD J., WYMAN J. et CHANGEUX J.P., 1965 - On the nature of allosteric transitions : a possible model. J. molec. Biol., 12, 88-118.
- NAGUIB M.I., 1962 - Effect of benzoic acid and its derivatives on plant metabolism. I. Effect of benzoic acid and its hydroxy-derivatives on respiration of starved and sucrose-fed etiolated Barley leaves. In. Bulletin of Faculty of Science Cairo University, 38, 61-72.
- NAIR P.M. et VINING L.C., 1965 - Cinnamic acid hydroxylase in Spinach. Phytochemistry, 4, 161-168.
- NARI J., MOUTTET C., PINNA M.H. et RICARD J., 1972 - Some physico-chemical properties of L-phenylalanine ammonia-lyase of wheat seedlings. FEBS Letters, 23, 220-224.
- NEISH A.C., 1960 - Biosynthesis pathways of aromatic compounds Annu. Rev. Plant Physiol., 11, 55-80
- NEISH A.C., 1961 - Formation of m- and p-coumaric acids by enzymatic deamination of the corresponding isomers of tyrosine. Phytochemistry, 1, 1-24.
- NEISH A.C., 1964 - Major pathways of biosynthesis of phenols. In. Biochemistry of phenolic compounds. J.B. HARBORNE éd., Academic Press, London and New York, pp. 295-359.
- NITSCH J.P., 1966 - Phytohormones et genèse des bourgeons végétatifs et floraux. In. Les phytohormones et l'organogénèse. Congr. Colloq. Univ. Liège, 265-299.
- NITSCH J.P. et NITSCH C., 1962 - Composés phénoliques et croissance végétale. Ann. Physiol. vég., 4, 211-225.
- OAKS A. et BIDWELL R.G.S., 1970 - Compartmentation of intermediary metabolites. Annu. Rev. Plant Physiol., 21, 43-66.

- PATIL S.S. et ZUCKER M., 1965 - Potato phenolases. Purification and properties. J. Biol. Chem., 240, 3938-3943.
- PAULET P., 1966 - Stimulation de la néoformation in vitro de bourgeons végétatifs et floraux chez deux Nicotiana et leur hybride. In. Les phytohormones et l'organogenèse. Congr. Colloq. Univ. Liège, 323-340.
- PAULET P. et LIORET C., 1966 - La néoformation des bourgeons chez Nicotiana : sensibilité aux composés phénoliques externes, insensibilité aux composés phénoliques internes. In. Les phytohormones et l'organogenèse. Congr. Colloq. Univ. Liège, 341-349.
- PICHAT L., 1970 - Méthodes radiochimiques de mesure in vitro d'activités enzymatiques. Bulletin d'Informations Scientifiques et Techniques du C.E.A., 147, 49-54.
- PICTET G. et BRANDENBERGER H., 1960 - Substances polyphénoliques des plantes. II. Séparation des acides phénoliques du café vert et du café rôti. J. of Chromatogr., 4, 396-409.
- PICKETT-HEAPS J.D., 1968 - Xylem wall deposition. Radioautographic investigations using lignin precursors. Protoplasma, 65, 181-205.
- PILET P.E., 1966 - Effect of p-hydroxybenzoic acid on growth, auxin content and auxin catabolism. Phytochemistry, 5, 77-82.
- PLOTNIKOVA I.V. et RUNKOVA L.N., 1973 - Polyphenolic substances content in relation to growth and abscission of the black currant fruits. 3rd Symposium on accumulation and translocation of nutrients and regulators in plant organisms. Warszawa, Jablonna, Skierniewice, Brzezna, Krakow, 14-18 Mai.
- PODSTOLSKI A.J. et BROWN G.N., 1974 - L-phenylalanine ammonia-lyase activity in Robinia pseudoacacia seedlings. I. Cyclic phenomenon activity during continuous light. Plant Physiol., 54, 41-43.
- POWLS R. et HEMMING F.W., 1966 - The biosynthesis of quinones from p-hydroxybenzoic acid in Euglena gracilis var. bacillaris. Phytochemistry, 5, 1249-1255.
- PRIDHAM J.B., 1963 - Paper electrophoresis of phenolic compounds. In. Methods in polyphenol chemistry. J.B. PRIDHAM éd., Pergamon Press, Oxford, London, Edimburg, New York, Paris, Frankfurt, pp. 111-124.

- PRIDHAM J.B., 1965 - Low molecular weight phenols in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol., 16, 13-36.
- PRYCE R.J., 1972 - Gallic acid as a natural inhibitor of flowering in Kalanchoe blossfeldiana. Phytochemistry, 11, 1911-1918.
- QUARMBY C., 1968 - The use of polyvinylpyrrolidone in the thin layer chromatographic separation of flavonoids and related compounds. J. of Chromatogr., 34, 52-58.
- QUASTEL J.M. et Van STRATEN S.F., 1952 - Protein separation and interactions on filter paper. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 81, p. 6.
- RABIN R.S. et KLEIN R.M., 1957 - Chlorogenic acid as a competitive inhibitor of indole-acetic acid oxydase. Arch. Biochem. Biophys., 70, 11-15.
- RANDERATH K., 1963 - Thin layer chromatography. Verlag Chemie GmbH-Wein-heim/Bergstr. Academic Press New York and London
- RANGANATHAN S. et RAMASARMA T., 1971 - Enzymic formation of p-hydroxybenzoate from p-hydroxycinnamate. Biochem. J., 122, 487-493.
- RANJEVA R., 1971 - Sur quelques propriétés in vitro de la phénylalanine ammoniacque-lyase des feuilles de Quercus pedunculata (Ehrh.). Thèse Doct. Spécialité, Toulouse.
- REED D.J., 1968 - Methodology of radiotracer enzyme assays. Atom-light, 66, 1-12.
- REIO L., 1958 - A method for the paper-chromatographic separation and identification of phenol derivatives mould metabolites and related compounds of biochemical interest, using a "reference system" J. of Chromatogr., 1, 338-373.
- REIO L., 1960 - Supplementary data for the paper-chromatographic separation and identification of phenol derivatives and related compounds of biochemical interest, using a "reference system". J. of chromatogr., 4, 458-476.
- RIBEREAU-GAYON P., 1964 - Les composés phénoliques du raisin et du vin. I. Les acides phénols. Ann. Physiol. vég., 6, 119-147.
- RIBEREAU-GAYON P., 1965 - Identification d'esters des acides cinamiques et de l'acide tartrique dans les limbes et les baies de V. vinifera. C. R. Acad. Sci., 260, 341-343.

- RICARD J., MOUTTET C. et NARI J., 1974 - Subunit interactions in enzyme catalysis. Kinetic models for one-substrate polymeric enzymes. European J. Biochem., 41, 479-497.
- ROBB D.A., SWAIN T. et MAPSON L.W., 1966 - Substrates and inhibitors of the activated tyrosinase of broad bean (Vicia faba L.). Phytochemistry, 5, 665-675.
- ROCHA V. et TING I.P., 1971 - Malate dehydrogenases of leaf tissue from Spinacia oleracea. Properties of three isoenzymes. Arch. Biochem. Biophys., 147, 114-122.
- ROUBAIX (de) J. et LAZAR O., 1960 - The inhibitory substances contained in sugar beet glomerules. In. Phenolics in plants in health and disease. J.B. PRIDHAM éd., Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris, pp. 35-41.
- ROY B.N., ROYCHOUDHURY N., BOSE T.K., et BASU R.N., 1972 - Endogenous phenolic compounds as regulators of rooting in cuttings. Phyton, 30, 147-151.
- RUIS H. et KINDL H., 1971 - Formation of α, β -unsaturated carboxylic acids from amino acids in plant peroxisomes. Phytochemistry, 10, 2627-2631.
- RUSSEL A., 1935 - The natural tannins. Chem. Rev., 17, 155-186.
- RUSSELL D.W., 1971 - The metabolism of aromatic compounds in higher plants. X. Properties of the cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings and some aspects of its metabolic and developmental control. J. Biol. Chem., 246, 3870-3878.
- RUSSELL D.W. et CONN E.E., 1967 - The cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings. Arch. Biochem. Biophys., 122, 256-258.
- RUSSELL D.W., CONN E.E., SUTTER A. et GRISEBACH H., 1968 - Hydroxylation-induced migration and retention of tritium on conversion of (4-³H) cinnamic acid to 4-hydroxycinnamic acid by an enzyme from pea seedlings. Biochim. Biophys. Acta, 170, 170-213.
- SANDERSON G.W. et PERERA B.P.M., 1966 - Removal of polyphenolic compounds interfering with carbohydrate determinations in plant extracts with an insoluble polyphenol. Analyst., 91, 335-336.
- SATÔ M., 1966 - Metabolism of phenolic substances by the chloroplasts. II. Conversion by the isolated chloroplasts of p-coumaric acid to caffeic acid. Phytochemistry, 5, 385-389.

- SATÔ M., 1969 - The conversion by phenolase of p-coumaric acid to caffeic acid with special reference to the role of ascorbic acid. Phytochemistry, 8, 353-362.
- SCHACHTER D. et TAGGART J.V., 1953 - Benzoyl-CoA and hippurate synthesis. J. Biol. Chem., 203,
- SCHMID H. et KARRER P., 1945 - Helvetica Chimica Acta, 28, p. 722
Cit   par KARRER W. (1958).
- SEKI T., INAMORI K. et SANO K., 1959 - Chromatographic separation of phenolic acids. J. Biochem., Jap., 46, 1653-1657.
- SHAW C.R., 1969 - Isozymes : classification frequency and significance. Intern. Rev. Cytol., 25, 297-332.
- SHNITKA T.K. et SELIGMAN A.M., 1971 - Ultrastructural localisation of enzymes. Annu. Rev. Biochem., 40, 375-396.
- SHOPFER P., 1971 - Die phenylalanin ammoniumlyase (PAL, E.C. 4.3.1.5.) des Senfkeimlings (Sinapis alba L.) ein elektrophoretisch einheitliches Enzym. Planta, 99, 339-346.
- SMITH I., 1960 - Chromatographic and electrophoretic techniques. W. HEINEMANN Medical Books Ltd London and Intersciences Publishers, New York, Vol. 1, p. 324.
- SONDHEIMER E., 1958 - On the distribution of caffeic acid and the chlorogenic acid isomers in plants. Arch. Biochem. Biophys., 74, 131-138.
- SPACKMANN D.H., STEIN W.H. et MOORE S., 1958 - Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal. Chem., 30, 1190-1210.
- STADTMAN E.R., 1963 - Symposium on multiple forms of enzymes and control mechanisms. II. Enzyme multiplicity and function in the regulation of divergent metabolic pathways. Bacteriol. Rev., 27, 170-181.
- STADTMAN E.R., 1968 - The role of multiple enzymes in the regulation of branched metabolic pathways. Ann. New York Acad. Sci., 151, 516-530.
- STAFFORD H.A., 1964 - Comparison of lignin-like products found naturally or induced in tissues of Phloem Elodea and Coleus and in paper peroxidase system. Plant Physiol., 39, 350-360.

- STAFFORD H.A., 1974 - The metabolism of aromatic compounds. Annu. Rev. Plant Physiol., 25, 459-486.
- STAFFORD H.A. et BLISS M., 1973 - The effect of greening of Sorghum leaves on the molecular weight of a complex containing 4-hydroxycinnamic acid hydroxylase activity. Plant physiol., 52, 453-458.
- STAHL E., 1962 - Dünnschicht-Chromatographie. Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- STECK W. et WENDER S.H., 1965 - Paper chromatography in benzene-acetic acid-water as an aid in estimating free hydroxyl groups in phenolic compounds. J. of Chromatogr., 19, 564-571.
- STÖCKIGT J. et ZENK M.H., 1974 - Enzymatic synthesis of chlorogenic acid from caffeoyl Coenzyme A and quinic acid. FEBS Letters, 42, 131-134.
- STÖCKIGT J., MANSELL R.L., GROSS G.G. et ZENK M.H., 1973 - Enzymic reduction of p-coumaric acid via p-coumaroyl-CoA to p-coumaroyl alcohol by a cell-free system from Forsythia sp. Z. Pflanzenphysiol., 70, 305-307.
- STOLL A., RENZ J. et BRACK A., 1950 - Isolierung und Konstitution des Echinacosids, eines glykosids aus den wurzeln von Echinacea angustifolia D.C. Helv. chim. Acta, 33, 1877-1893.
- STURM A. Jr. et SCHEJA H.W., 1964 - Die trennung der phenolsäuren mit hilfe der hochspannungs-elektrophorese. J. of Chromatogr., 16, 194-200.
- SWAIN T., 1953 - The identification of coumarins and related compounds by filter paper chromatography. Biochem. J., 53, 200-208.
- SWAIN T. et HILLIS W.E., 1959 - The phenolic constituents of Prunus domestica. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. J. Sci. Food Agric., 10, 63-68.
- TANGUY J. et MARTIN C., 1972 - Sur quelques constituants phénoliques des feuilles cotylédonnaires de plantules de Phaseolus vulgaris, variété Pinto. C. R. Acad. Sci., 274, 3402-3404
- TATEOKA T.N., 1968 - Formation of protocatechuic acid from 5-dehydrodroshikimic acid in the extract of Mung bean seedling. Bot. Mag., Jap., 81, 103-104.

- TAYLOR A.O. et ZUCKER M. 1966 - Turnover and metabolism of chlorogenic acid in Xanthium leaves and potato tubers. Plant Physiol., 41, 1350-1359.
- THALLER V., 1963 - Thin layer chromatography. In: Methods in Polyphenol chemistry. J.B. PRIDHAM éd., Pergamon Press, Oxford, London, Edinburgh, New York, Paris, Frankfurt, pp. 81-88.
- THIMANN K.V., 1936 - Auxins and the growth of roots. Amer. J. Bot., 23, 561-569.
- TOLBERT N.E., 1971 - Microbodies-peroxisomes and glyoxysomes. Annu. Rev. Plant Physiol., 22, 45-74.
- TOLBERT N.E., OESER A., YAMAZAKI R.K., HAGEMAN R.H. et KISAKI T., 1969 - A survey of plants for leaf peroxisomes. Plant Physiol., 44, 135-147.
- TOMASZEWSKI M., 1964 - The mechanism of synergistic effects between auxin acid some natural phenolic substances. In: Régulateurs naturels de la croissance végétale. C.N.R.S. Paris pp. 335-351.
- TOWERS G.H.N., 1964 - Metabolism of phenolics in higher plants and micro-organisms. In: Biochemistry of phenolic compounds. J.B. HARBORNE éd., Academic Press, London and New York, pp. 249-294.
- TRELEASE R.N., BECKER W.M., GRUBER P.J. et NEWCOMB E.H., 1971 - Microbodies (glyoxysomes and peroxisomes) in cucumber cotyledons. Correlative biochemical and ultrastructural study in light- and dark-grown seedlings. Plant Physiol., 48, 461-475.
- URBAN R., 1959 - Physiologische untersuchungen über einige flavonoide und oxyzimtsäuren. II. Mitteilung : Untersuchungen über den Jahreszeitlichen und Tages-Periodischen verlaufs der stoffbildung. Planta, 52, 565-582.
- VANCE C.P., NAMBU DIRI A.M.D. et TOWERS G.H.N., 1973 - Cinnamate-4-hydroxylase in Polyporus hispidus. Can. J. Biochem., 51, 731-734.
- VAN SUMERE C.F., 1960 - Germination inhibitors in plant material. In: Phenolics in plants in health and disease. J.B. PRIDHAM éd., Pergamon Press Oxford, London, New York, Paris, pp. 25-34.
- VAN SUMERE C.F., VAN SUMERE-De PRETER C., VINING L.C. et LEDINGHAM G.A., 1957 - Coumarins and phenolic acids in the Uredospores of wheat stem rust. Can. J. Microbiol., 3, 847-862.

- VAN SUMERE C.F., WOLF G., TEUCHY H. et KINT J., 1965 - A new thin layer method for phenolic substances and coumarins. J. of Chromatogr., 20, 48-60.
- VAN SUMERE C.F., COTTENIE J., De GREEF J. et KINT J., 1972 - Biochemical studies in relation to the possible germination to the possible germination regulatory role of naturally occurring coumarin and phenolics. In. Recent advances in phytochemistry, 4, 165-221.
- VAN SUMERE C.F., De POOTER H., HAIDER ALI et DEGRAUW-VAN BUSSEL M., 1973 - N-feruloylglycyl-L-phenylalanine : a sequence in barley proteins. Phytochemistry, 12, 407-411.
- VAN TEELING C.G., CANSFIELD P.E., et GALLOP R.A., 1971 - Chromatography of anthocyanins on columns of insoluble polyvinylpyrrolidone. J. of Chromatogr., Science, 9, 505-509.
- VAUGHAN P.F.T. et BUTT V.S., 1967 - Electron-donor requirements in the hydroxylation of p-coumaric acid. Biochem. J., 104, 65-66.
- VAUGHAN P.F.T. et BUTT V.S., 1969 - The hydroxylation of p-coumaric acid by an enzyme from leaves of spinach beet (Beta vulgaris L.). Biochem. J., 113, 109-115.
- VIEITEZ E., SEOANE E., GESTO D.V., MATO C., VÁZQUEZ A. et CARNICER A., 1966 - p-hydroxybenzoic acid, a growth regulator, isolated from woody cuttings of Ribes rubrum. Physiol. Plant., 19, 294-307.
- VIEITEZ E., SEOANE E., GESTO M.D.V., VÁZQUEZ A., MÉNDEZ J., CARCINER A. et ARESES M.L., 1967 - Growth substances isolated from woody cuttings of Castanea sativa Mill. Phytochemistry, 6, 913-920.
- VOLLMER K-O. et GRISEBACH H., 1966 - Zur Biosynthese der Benzoesäuren in Gaultheria procumbens III. Z. Naturforsch., 21, 435-439.
- VOLLMER K-O., REISENER H.J. et GRISEBACH H., 1965 - The formation of acetic acid from p-hydroxycinnamic acid during its degradation to p-hydroxybenzoic acid in wheat shoots. Biochem. Biophys. Res. Communic., 21, 221-225.
- WATANABE R., CHORNEY W., SKOK J. et WENDER S.H., 1964 - Effect of boron deficiency on polyphenol production in the sunflower. Phytochemistry, 3, 391-393.

- WEBSTER L.T., Jr., MIEYAL J.J. et SIDDIQUI U.A., 1974 - Benzoyl and hydroxy benzoyl esters of coenzyme A. Ultraviolet characterization and reaction mechanisms. J. Biol. Chem., 249, 2641-2644.
- WEBSTER R.E., ENGELHARDT D.I. et ZINDER N.D., 1966 - In vitro protein synthesis : chain initiation. Biochemistry, 55, 155-161.
- WHISTANCE G.R., THRELFALL D.R. et GOODWIN T.W., 1966 - Incorporation of (G ^{14}C) shikimate and (U ^{14}C) para-hydroxybenzoate into phytoquinones and chromanols. Biochem. Biophys. Res. Commun., 23, 849-853.
- WHISTANCE G.R., THRELFALL D.R. et GOODWIN T.W., 1967 - Observations on the biosynthesis of phytoterpenoid quinone and chromanol nuclei. Biochem. J., 105, 145-154.
- WHITE T., 1957 - Tannins. Their occurrence and significance. J. Sci. Food Agric., 8, 378-385.
- WILLIAMS C.M., 1962 - Gas chromatography of urinary aromatic acids. Ann. Biochem., 4, 423-432.
- WILLIS J.C., 1931 - A dictionary of the flowering plants and ferns. 6e éd., University Press, Cambridge.
- WILSON J.L., DUNLAP W.J. et WENDER S.H., 1968 - Quantitative determination of chlorogenic acid in plant tissue by combined polyvinylpyrrolidone column and gas chromatography. J. of Chromatogr., 35, 329-335.
- WRIGHT H.E. Jr., 1962 - The phenolics of tobacco and their significance. In: Plant phenolics and their industrial significance. Proceedings of a symposium of the plant phenolics group of North America. V.C. RONECKLES éd., pp. 39-58.
- WRIGHT H.E. Jr., BURTON W.W. et BERRY R.C. Jr., 1960 - Soluble browning reaction pigments of aged burley tobacco. I. The non-dialyzable fraction. Arch. Biochem. Biophys., 86, 94-101.
- YANG C-H. et WENDER S.H., 1962 - Free phenolic acids in cigarette smoke and tobacco. Paper chromatography separation and identification. J. of Chromatogr., 8, 82-89.
- YOSHIDA S., 1969 - Biosynthesis and conversion of aromatic amino acids in plants. Annu. Rev. Plant Physiol., 20, 41-62.

- ZAPROMETOV M.N. et BUKHLAEVA V.Y., 1968 - Concerning two pathways of biosynthesis of gallic acid. Biokhimi a, 33, 383-386.
- ZENK M.H., 1966-Biosynthesis of C₆-C₁ compounds. In. Biosynthesis of aromatic compounds. G. BILLEK éd. Pergamon Press, Oxford, London, Edinburgh, New York, Toronto, Paris, Braunschweig, pp. 45-60.
- ZENK M.H. et MÜLLER G., 1963 - In vivo destruction of exogenously applied indolyl-3-acetic acid as influenced by naturally occurring phenolic acids. Nature, 200, 761-763.
- ZENK M.H. et MÜLLER G., 1964 - Biosynthese von p-hydroxybenzoesäure und anderer benzoesäuren in höheren pflanzen. Z. Naturforsch., 19 b, 398-405.
- ZUCKER M., 1965 - Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. Plant Physiol., 40, 779-784.
- ZUCKER M., 1972 - Light and enzymes. Annu. Rev. Plant Physiol., 23, 133-156.
- ZSCHOCHÉ W.C. et TING I.P., 1973 - Malate dehydrogenases of Pisum sativum. Tissue distribution and properties of the particulate forms. Plant Physiol., 51, 1076-1081.

